Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Joachim Mallach

Zur Frage der Bildung von Aminosäure-aethylestern nach Alkoholgenuß

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Reinhard Achinger
aus Wingeshausen

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0051

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Joachim Mallach

Zur Frage der Bildung von Aminosäure-aethylestern nach Alkoholgenuß

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Reinhard Achinger
aus Wingeshausen

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H. Knüttgen

Berichterstatter: Professor Dr. med. H.J. Mallach

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

DISPOSITION

		Seite
I.	Einführung: Das Alkoholdefizit	1
	1. Einfluß der Resorptionsbedingungen	2
	2. Einfluß der Fette	5
	3. Einfluß der Kohlenhydrate	7
	4. Einfluß der Eiweiße	9
II.	Die Voraussetzungen zur Bildung von Aminosaure-aethylestern im menschlichen Organismus	14
	1. Menge und Verteilung der Aminosäuren	14
	2. Resorptionsverhalten der Aminosäuren	24
	3. Bildung der Aminosäure-aethylester	30
III.	Hinweise im Schrifttum zur chromatographischen Auftrennung der Aminosäuren und ihrer Ester	34
	1. Trennung der Säuren und Ester	34
	2. Serumaufbereitung	35
	a) Entfernung des Eiweißes	36
	b) Entfernung der Lipoide	37
	c) Entfernung der Salze	38
	d) Anfärbung der Aminosäuren und ihrer Ester	39
	e) Quantitative Bestimmung der Aminosäuren und ihrer Ester	40
IV.	Eigene Untersuchungen	42
	1. Darstellung der Aminosäuren aus Serum	42
	2. Darstellung der Aminosäure-aethylester aus Serum (Zusatzversuche)	44

Seite

3. Trennung der Aminosäuren und ihrer Aethylester durch Dünnschichtchromatographie 45

a) Auftragen der Lösungen 46

b) Auftrennung der Aminosäuren 47

c) Auftrennung der Aminosäure-aethylester 57

d) Anfärbung und quantitativer Nachweis der Aminosäuren und ihrer Aethylester 62

V. Diskussion 72

VI. Zusammenfassung 78

VII. Literatur 79

I. EINFÜHRUNG

Es ist allgemein bekannt, daß eine reichliche Nahrungsaufnahme kurz vor, oder auch während des Alkoholgenusses sowohl die subjektive, als auch in gewissem Maße die objektive Wirkung zu mindern vermag. Frühe alkoholphysiologische Untersuchungen ergaben bereits erste einschlägige Hinweise. So fand schon GRÉHANT (1900) einen auffallend flachen Verlauf der Blutalkoholkurven nach oraler Gabe im Gegensatz zur Verlaufsform nach intravenöser Zufuhr; diese Befunde führten zu ersten Überlegungen über den Einfluß der Resorption und darüber hinaus auch des Magen-Darminhalts auf den Kurvenverlauf.

VÖLTZ, BAUDREXEL und DIETRICH (1912 a und b) führten Hunden auf leeren und vollen Magen oral 2 ml Alkohol/kg Körpergewicht zu. Den Nahrungseinfluß auf das intrakorporale Verhalten des Alkohols versuchten sie durch das Maß der Ausscheidung in Urin und Atemluft zu prüfen. Nach Alkoholgabe auf vollen Magen sank die Ausscheidung im Urin auf ein Achtel, in der Atemluft auf ein Drittel des Nüchternwertes ab. Gleiche Versuche am Menschen mit einer Alkoholbelastung von 0,8 ml/kg ergaben ein Verhältnis der entsprechenden Urinalkoholkonzentrationen von 1:7,4 und 1:2,6. Diese Ergebnisse konnten unter anderen von WIDMARK (1914) bestätigt werden, der ein Verhältnis von 1:5 bestimmte.

Eine sehr eindrucksvolle Darstellung des Nahrungseinflusses auf die Blutalkoholkonzentration stammt von MELLANBY (1919). Er untersuchte an Hunden sowohl den Einfluß unterschiedlicher Nahrungskarenzen, d.h. Zeitabstand zwischen Nahrungsaufnahme und Alkoholzufuhr, als auch die Auswirkungen verschiedener Nahrungsmittel und deren Menge auf Gipfelpunkt und Verlauf des Blutalkoholspiegels. Nach Nahrungsaufnahme verliefen die Blutalkoholkurven stets flacher als die Nüchternkurven. Die Differenzen

zeitlich korrespondierender Werte wurden jedoch umso kleiner, je größer die Nahrungskarenzen wurden. Neben der Abflachung der Kurve beobachtete MELLANBY aber auch einen späteren Eintritt des Gipfelpunktes; er schloß daraus auf eine Verlangsamung der Resorption unter dem Einfluß der Nahrung.

Zu der gleichen Schlußfolgerung zwingt ein Vergleich der Versuchsergebnisse von MILES (1922), sowie von BORNSTEIN und BUDELMANN (1930). Während MILES die höchste Alkoholkonzentration im Urin 60 bis 90 Minuten nach Alkoholgabe fand, beobachteten BORNSTEIN und BUDELMANN das Maximum bereits nach 30 Minuten. Dieser auffällige Unterschied in den Anstiegsgeschwindigkeiten ist offenbar darauf zurückzuführen, daß die Versuchspersonen von MILES alimentär nicht nüchtern waren.

In der Folgezeit wurde der Verlauf von Blutalkoholspiegeln sowohl nach oraler, als auch nach intravenöser Zufuhr wiederholt am Tier überprüft. Die Kurvenverläufe waren nach oraler Gabe stets niedriger. Vergleichende Untersuchungen bei Nüchternheit und nach Magenfüllung wiesen zwar stets den Nahrungseffekt nach; sie zeigten aber auch, daß Tierversuche infolge der außerordentlich großen Streuung der Meßwerte sowohl zwischen Versuchstieren gleicher, als auch verschiedener Spezies, sowie ferner wegen der sehr langen und wechselnden Dauer der Resorptionszeiten zur Klärung der aufgeworfenen Problematik ungeeignet sind. Außerdem erlauben die aus Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse keine Rückschlüsse auf die Resorptionsverhältnisse des Menschen.

1. EINFLUSS DER RESORPTIONSBEDINGUNGEN

Nun erhebt sich die Frage, welche Ursache diesem so oft beobachteten Einfluß der Nahrung zugrunde liegt. Nach den Angaben im Schrifttum wurde in erster Linie an eine Änderung der Resorptionsbedingungen gedacht. So wäre es unter der Annahme, daß sich der Alkohol mit der im Magen-

Darmtrakt befindlichen Nahrung mischt und somit vor der Resorption in seiner Konzentration vermindert wird, durchaus vorstellbar, daß die Konzentration einer Alkohollösung oder eines alkoholhaltigen Getränkes einen Einfluß auf die Resorptionsgeschwindigkeit ausübt.

Untersuchungen über den Einfluß unterschiedlich konzentrierter wäßriger Alkohollösungen erbrachten widersprüchliche Ergebnisse. So fand MELLANBY (1919) nach Zufuhr gleicher Alkoholdosen einen steileren Anstieg und ein höheres Maximum seiner Kurven nach Gabe von 20%igem als nach Gabe von 5%igem Alkohol. Allerdings stützt sich dieses Ergebnis auf einen Versuch an einem Hund, so daß aus diesem zufälligen Ereignis keine weiteren Schlüsse gezogen werden sollten. Dies umso weniger, als die vergleichbaren Blutalkoholkurven untereinander sehr ähnlich sind. TUOVINEN (1930) kam dagegen zu einem anderen Ergebnis. Auch er führte gleiche Alkoholdosen in unterschiedlich konzentrierten Lösungen zu. Die Gipfelpunkte seiner Kurven traten jedoch nach Gabe von 5- und 20%igen Lösungen früher ein und erreichten höhere Werte als nach 40- und 60%igen Lösungen. Im weiteren Verlauf (nach 2 bis 6 Stunden) näherten sich seine Kurven einander. SIMONIN (1930) fand im Selbstversuch und bei höherer Dosierung an Meerschweinchen nach Gabe von 10%igem Alkohol den verabreichten Dosen proportionale Maxima der Blutalkoholspiegel. Wurde eine bestimmte Alkoholdosis in wechselnden Konzentrationen gegeben, so traten nach Gabe konzentrierter Lösungen höhere, nach Gabe weniger konzentrierter geringere Blutwerte auf.

In diesem Zusammenhang ist auch der Einfluß von Getränken mit unterschiedlichem Alkoholgehalt mehrfach untersucht worden. MELLANBY (1919) verabfolgte einem Hund 40 g Alkohol in Form von Whisky und Bier und beobachtete einen steileren Anstieg des Alkoholspiegels sowie einen höheren Gipfelpunkt nach Whiskygabe, gegenüber den weniger profilierten, aber gleichsinnig verlaufenden Bierkurven. Wurde Whisky auf die Alkoholkonzentration des Bieres verdünnt, so ergab sich gegenüber einer entsprechenden Menge Bier eine wesentlich raschere Resorption, während der gleich hohe Gipfel der Bierkurve erst etwa eine Stunde später auftrat.

MELLANBY schloß daraus, daß nicht nur die Konzentration der Alkohollösung von Bedeutung sei, sondern daß das Bier eine oder mehrere Substanzen enthalte, die eine besondere Resorptionshemmung bewirkten.

In den Versuchen von KÜHN (1924) erreichte die Blutalkoholkonzentration nach Gabe von zwei Flaschen Bier (26,68 ml Alkohol) nach dem Frühstück (250 g Fleisch, 65 g Margarine, 200 g Brot) nie höhere Werte als 0,06‰; ein Wert, der erfahrungsgemäß bei Zufuhr einer entsprechenden Menge Alkohol in wäßriger Lösung übertroffen wird. (Nüchternversuche hat er allerdings nicht durchgeführt.) Auch JUNGMICHEL (1933) beschreibt Trinkversuche mit Bier bei alimentärer Nüchternheit der Probanden. Er stellte nach Biergenuß einen deutlich niedrigeren Kurvenverlauf fest als nach Zufuhr des Alkohols in wäßriger Lösung. Einschränkend muß allerdings bemerkt werden, daß die Alkoholkonzentration der wäßrigen Lösung die des Bieres übertraf.

GOLDBERG und STÖRTEBECKER (1923) benutzten zum Nachweis des Nahrungseffektes sowohl Bier als auch Alkohol in anderen Darreichungsformen und stellten die Ergebnisse solchen aus Nüchterntrinkversuchen gegenüber. Man fand nach Verwendung von Bier stets einen geringeren Einfluß der Nahrung auf den Resorptionsverlauf als bei Verwendung anderer alkoholischer Getränke. Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß die Differenz der Werte zwischen Nahrungs- und Nüchternversuch aus dem Grunde so gering ausfiel, weil Bier nur unvollständig und langsam resorbiert wird.

Diese Ansicht hat viel für sich, zumal sich auch bei JUNGMICHEL (1933) bei Verwendung von Bier eine geringere Differenz zwischen den Kurven bei Nüchternheit und denen nach Nahrungsaufnahme findet als bei Verwendung einer gleichen Alkoholdosis, gelöst in Wasser.

MALLACH (1965, 1966) zeigte in ausführlichen und statistisch ausgewerteten Versuchen, daß die Blutalkoholkurve nach Biergenuß langsamer ansteigt, ihr Gipfelpunkt niedriger ist und später erreicht wird, als nach Schnapsgenuß.

Die Kurven zeigen gute Übereinstimmung mit denen von JUNGMICHEL (1933), ermöglichten jedoch darüberhinaus eine genauere Bestimmung der Gesetzmäßigkeiten ihres Anstieges. Auf die aus dem Verhalten des absteigenden Teils der Kurve gewonnenen Erkenntnisse wird an anderer Stelle einzugehen sein. MALLACH läßt die Deutung dieses unterschiedlichen Verlaufs seiner Kurven nach Bier- und Wodkagenuß offen, hält jedoch die von PONSOLD (1962) vertretene Ansicht, daß die durch reichliche Flüssigkeitsaufnahme entstehende Kugelform des Magens die Resorption des Alkohols vom Magen her verzögere, für naheliegend. Tatsächlich konnte WÜRMELING (1965) nachweisen, daß bei einer Blockade des Magenpförtners, die durch eine Störung der Magenmotilität durch pralle Füllung herbeigeführt werden soll, ein weit geringerer Anstieg der Blutalkoholkonzentration resultiert, als nach sofortiger Abgabe der zugeführten Dosis in den Darm. Obwohl die mitgeteilten Versuche mit gleichen Alkoholdosen gelöst in unterschiedlichen Wassermengen (MELLANBY 1919, SIMONIN 1930, MALLACH 1965, 1966) dieser Vorstellung entsprechen, ist damit die Annahme einer spezifischen, die Resorption hemmenden Substanz im Bier nicht ausgeschlossen.

Es erhebt sich also die Frage, ob der Einfluß der Nahrung auf Höhe und Verlauf des Blutalkoholspiegels von ihrer Zusammensetzung abhängt und welchen Bestandteilen im einzelnen eine besondere Wirkung zuzuschreiben ist. Bier enthält beispielsweise neben Aethanol und Wasser eine wechselnde Menge Kohlenhydrate, besonders in Form leicht resorbierbarer Dextrine und im Malz eine nicht unerhebliche Menge Eiweiß. Hinzu träten als dritter Hauptbestandteil der Nahrung die Fette.

2. EINFLUSS DER FETTE

MELLANBY (1919) fand nach Gabe von Alkohol in Vollmilch eine stärkere Abflachung seiner Kurven gegenüber Alkohol in fettfreier Milch; er schloß daraus auf einen besonderen Einfluß des Fettes. Zur Deutung dieses Effek-

tes verabfolgte er Hunden 50 ml reinen Alkohols in 20%iger Konzentration nach Zufuhr von 100 g Talg und fand einen erheblich flacheren Kurvenverlauf als nach Gabe einer Alkoholdosis in 5%iger Lösung. Nach diesen Ergebnissen vermutete er, daß Fett höher konzentrierten Alkohol physikalisch binde und die zu erwartende Resorptionsrate des Alkohols verkleinere. Eine derartige physikalische Bindung sei dagegen mit gering konzentriertem Alkohol nicht möglich. Diese Vorstellung ist insofern von Interesse, als sie zu dem an anderer Stelle und aus anderen Gründen geäußerten Gedanken an eine chemische Bindung des Alkohols an Nahrungsbestandteile in einer gewissen Beziehung steht.

HANZLIK und COLLINS (1913) bestimmten die Resorption aus abgebundenen Katzendarmschlingen und beschrieben nach Zufuhr von 2 ml Öl eine Resorptionsverminderung um 25%. Auch VERNON (1928) stellte einen merkbaren Einfluß der Fette fest, der nach seinen Untersuchungen den der Eiweiße übertrifft. SIMONIN (1930) dagegen fand nach Einnahme einer fettreichen Kost lediglich eine Verzögerung der Resorption, im übrigen jedoch die gleichen Blutalkoholwerte wie im Nüchternversuch. WIDMARK (1933 a) bezeichnet die Ölsäure als wirksam, nicht aber Glycerin und Neutralfett (NEYMARK und WIDMARK 1936 a und b).

Mit Ausnahme von DONTCHEFF (1937 a und b), der die Abflachung seiner Kurven als Verbrennungsbeschleunigung deutet, wird der beschriebene Effekt der Fette stets als Resorptionshemmung aufgefaßt. ELBEL und SCHLEYER (1956) wenden jedoch ein, daß während der Zeitspanne der maximalen Lipämie mit einer Minderung der Löslichkeit des Alkohols im Blut, also mit einer Steigerung des Verteilungskoeffizienten 'r' gerechnet werden muß, was durchaus eine Verminderung der Resorption vorzutäuschen vermag.

3. EINFLUSS DER KOHLENHYDRATE

Ein Einfluß der Kohlenhydrate wird von mehreren Autoren, darunter WIDMARK (1933 a), ausdrücklich verneint. Nun ist eine Beeinflussung im Sinne einer Resorptionshemmung auch nicht sonderlich wahrscheinlich. Im Hinblick auf die Verwandtschaft zwischen Alkohol und Kohlenhydratstoffwechsel erscheint eine Beeinflussung der Abbaugeschwindigkeit jedoch denkbar. BORNSTEIN und LOEWY (1931) wiesen nach, daß Alkohol bei gemeinsamer Gabe mit Zucker immer zuerst verbrennt. Sie fanden eine sofortige Senkung des Respirationsquotienten, die sogar über die Rückkehr der Blutalkoholkurve hinaus anhielt; erst danach stieg er auf den den Kohlenhydraten zuzuordnenden Wert. Aus diesem Verhalten schlossen sie auf eine Speicherung des Alkohols im Gewebe. GREMELS (1948) bestätigte diese Ergebnisse. ELBEL (1938) versuchte, die bei Versuchen mit Alkohol und Medikamenten störende Minderung der Leistungsfähigkeit seiner Versuchspersonen durch Gabe von Dextroenergen zu beheben, dessen leistungssteigernde Wirkung zuvor von HEPP (1937) nachgewiesen worden war. Er fand keinerlei Abweichungen der Blutalkoholkurve und der Leistungsfähigkeit seiner Versuchspersonen von den im Nüchternversuch erhobenen Befunden.
Auch CLARK und MORRISSEY (1938) experimentierten mit Traubenzucker, konnten aber ebenfalls keine Auswirkung auf Resorption und Verbrennungsgeschwindigkeit nachweisen. GOLDFARB, BOWMAN und PARKER (1939) fanden zwar eine Beeinflussung der Blutalkoholkurve durch Traubenzucker, jedoch erst dann, wenn die Werte 3‰ überschritten. CHAPHEAU (1934 a und b) beeinflußte den Blutzuckerspiegel bei Kaninchen durch Phlorrhizin im Sinne einer Hypo- und durch Iodessigsäure in Richtung einer Hyperglykämie. Er fand keine Änderung der Abbaugeschwindigkeit. Die Beweiskraft dieses Experiments wird allerdings dadurch gemindert, daß er Alkohol oral zuführte.

CARPENTER und LEE (1937) bestimmten die Dauer der Alkoholausscheidung in der Atemluft im Nüchterntrinkversuch und nach Glukosegabe. Die

gefundene Zeitdifferenz von 115 zu 138 Minuten ist jedoch nicht überzeugend. Auch die von HAGGARD und GREENBERG (1937) gefundene Steigerung der Alkoholtoleranz bei Hunden läßt keine Rückschlüsse auf die Verbrennungsgeschwindigkeit zu, da die Toleranz von der Verbrennungsgeschwindigkeit nicht abhängig zu sein braucht. Nach BICKEL (1936) führt die Erhöhung des Blutzuckerspiegels zu einer Insulinmobilisierung und diese durch Zuckermetaboliten zu einer "Blockierung" der Ganglienzelle für Alkohol; diese Herabsetzung der physiologischen Wirkungsmöglichkeit des Alkohols könnte also eine Steigerung der Konzentrationstoleranz zur Folge haben.

In den Jahren nach dem II. Weltkrieg wurde der Fruktosewirkung auf den Alkoholstoffwechsel besondere Bedeutung zugemessen, doch sind die Angaben im Schrifttum widersprüchlich. KLEIN (1952) fand bei 10 Versuchspersonen eine deutliche Senkung der Konzentrationen nach oraler Fruktosegabe gegenüber 10 Kontrollpersonen. Auch nach Zufuhr von Fruktose durch Dauertropfinfusionen resultierten bei oraler Alkoholgabe - auch in der Resorptionsphase - niedrigere Blutwerte; hieraus wurde geschlossen, daß die niedrigeren Blutalkoholspiegel nicht oder nicht allein auf eine Änderung der Resorptionsbedingungen zurückzuführen sind. Nach ELBEL und SCHLEYER (1956) beweist dieses Ergebnis keine Verbrennungsbeschleunigung; sie verweisen auf BAUM (1953), der nach Gaben von Kochsalz ähnliche Kurvenverläufe beobachtete wie SEIFERT und GÜNTHER (1951) nach Rohrzuckergaben. Wahrscheinlich bewirken konzentrierte Salz- und Zuckerlösungen eine Wasserverschiebung vom Blut ins Gewebe. Es ist denkbar, daß diese Wasserverschiebung ein Absinken des Alkoholgehaltes im Blut bedingt und dementsprechend zu einem Anstieg der Werte für den Verteilungskoeffizienten und für den Stundenabfallwert (β_{60}) führt, ohne daß damit eine Verbrennungsbeschleunigung verbunden wäre. Dieser Einwand gilt auch für die Ergebnisse von BERG (1953). STUHLFAUTH (1954) beobachtete nach Dauertropfinfusion einer 5%igen Laevosanlösung einen Abfall der Blutalkoholkurve und deutete diesen Effekt als Verbrennungsbeschleunigung; doch halten seine Ergebnisse einer kritischen Nachprüfung nicht stand.

LOOMIS (1950) fand in Tierversuchen weder eine Beeinflussung des Blutzuckerspiegels durch Alkohol, noch eine Änderung der Alkoholabbaugeschwindigkeit durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel. Auch ein gesteigerter Zuckerstoffwechsel oder Insulin- und Glukosezufuhr änderten die Alkoholverbrennung nicht. Mit diesen Beobachtungen stimmen die Ergebnisse von KULPE und MALLACH (1960) gut überein. Sie untersuchten ohne Glukosezufuhr den Einfluß des Alkohols auf den Blutzuckerspiegel. Sie erhielten eine Mittelwertkurve von sinusförmigem Verlauf. Eine am Vortage an denselben Versuchspersonen gewonnene Nüchternzuckerkurve zeigte dieses Verhalten nicht. Eine gesetzmäßige Beziehung zwischen der Alkoholumsatzgeschwindigkeit und dem Grad des Blutzuckerabfalls war aber nicht erkennbar. Eine Beteiligung des Kohlenhydratstoffwechsels am Alkoholabbau ist sonach nicht wahrscheinlich. KULPE und MALLACH vermuten, gestützt auf die in der Literatur mitgeteilten Erfahrungen, eine Blockierung der Insulinasewirkung in der Leber und damit indirekt, über eine Erhöhung der Insulinwirkung eine Blutzuckerdepression.

4. EINFLUSS DER EIWEISSE

Der Einfluß von Eiweiß auf Höhe und Verlauf der Blutalkoholkurve ist von zahlreichen Autoren untersucht worden. Schon die Ergebnisse von MELLANBY lassen einen Einfluß des Eiweißes auf den Alkoholumsatz auf Grund seiner Untersuchungen über die Wirkungen der Milch vermuten. Auch die von ihm, sowie auch von JUNGMICHEL (1933) und MALLACH (1965, 1966) mitgeteilten Blutalkoholkurven nach Biergenuß lassen eine Bedeutung des Eiweißes aus gegenwärtiger Sicht als denkbar erscheinen. JUNGMICHEL nahm zwar lediglich einen Zusammenhang mit dem Kaloriengehalt der Nahrung an, doch wurde dieser Ansicht bereits von ELBEL und LIECK (1936) widersprochen, die den entscheidenden Faktor in der Menge und Verdaulichkeit der Nahrung sahen. Sie fanden Mischkost als besonders wirksam. Doch auch dieses Ergebnis läßt an Eiweiß als wirksamen Bestand-

teil der Nahrung denken. Die Autoren beschreiben in derselben Arbeit einen Trinkversuch nach Gabe von 1400 g Spargel und erklärten die starke Resorptionsverzögerung durch die überaus große Nahrungsmenge. Spätere Beobachtungen machen jedoch eine besondere Bedeutung der Asparaginsäure wahrscheinlich.

So experimentierten HAGGARD und GREENBERG (1940) mit Aminosäuren. Sie beobachteten bei Ratten nach Zufuhr von Glycin eine erhebliche Resorptionsverzögerung.

Sehr eingehend beschäftigte sich WIDMARK (1933 a und b) mit diesem Problem. Seine Untersuchungen über die Gesetzmäßigkeiten des Alkoholabbaus (WIDMARK 1932) eröffneten die Möglichkeit, die im Organismus erscheinende Alkoholmenge zu berechnen und mit der oral zugeführten Menge zu vergleichen. Er stützt sich dabei auf die von ihm angegebene formelmäßige Beziehung: $A = c_0 \cdot p \cdot r$, die als unbekannte Größen c_0 und r enthält. Den Wert c_0 erhält man durch Extrapolation des postresorptiven Kurvenschenkels; er stellt den Schnittpunkt dieses extrapolierten Schenkels mit der Ordinatenachse, also den theoretischen Wert für die Blutalkoholkurve im Zeitpunkt 0 dar. Der Wert r ist eine dimensionslose Verteilungskonstante; nach WIDMARK ein Faktor, mit dem das Körpergewicht zu multiplizieren ist, um ein gedachtes Volumen, die "reduzierte Körpermasse" zu erhalten, in dem die Alkoholkonzentration der des Blutes gleichgesetzt werden kann.
DOST (1953) charakterisiert diese Konstante anschaulicher als "Verteilungsvolumen"; er gibt das Körpergewicht p in Gramm, die gegebene Alkoholdosis in mg und die Blutalkoholkonzentration (BAK) c_0 in mg/ml an. Bei dieser Betrachtungsweise stellt r das in ml auszudrückende "relative Verteilungsvolumen", in welches der resorbierte Alkohol pro Gramm Masse des Gesamtorganismus übergeht, dar.

WILDMARK (1932) führte zwei Versuchspersonen, deren Konstanten in Nüchternversuchen bestimmt worden waren, unmittelbar vor, während und

nach Einnahme einer Mahlzeit, die aus gebratenem Fleisch, Kartoffeln, Brot und Butter bestand, Alkohol zu und bestimmte nach 115, bzw. 142 Minuten nach Trinkbeginn beginnend in regelmäßigen Zeitabständen die jeweiligen Konzentrationen. Auf Grund der von ihm angegebenen Formel errechnete er Konsumptionen, die in dem einen Falle um 11,6% und in dem anderen um 17% unter der zugeführten Alkoholmenge lagen. Nach diesen Ergebnissen kommt einer Nahrungsaufnahme also weniger eine resorptionsverzögernde Wirkung als ein anderer Einfluß zu, der sich darin äußert, daß ein gewisses kleineres Quantum des konsumierten Alkohols überhaupt nicht als solcher resorbiert wird. WIDMARK verweist in diesem Zusammenhang auch auf SOUTHGATE (1926), der zwar eine verzögerte Resorption gelten läßt, daneben aber darauf hinweist, daß ein Teil des zusammen mit der Nahrung eingenommenen Alkohols niemals als Alkohol im Blut erscheint.

WIDMARK (1932) vermutet eine Esterbindung, bemerkt aber nach stöchiometrischen Uberlegungen, daß die Fettsäuremenge nicht hinreiche, um die nicht wiedergefundene Alkoholmenge zu binden. Deshalb vermutete er in den Aminosäuren den Reaktionspartner des Alkohols. In folgenden Tierversuchen (WIDMARK, 1933 a) konnte er nachweisen, daß Alkohol, zusammen mit Glycin oder Alanin zugeführt, einen niedrigeren Blutalkoholspiegel bedingte, als die Zufuhr der gleichen Menge Alkohol allein. In einer weiteren Arbeit (WIDMARK 1933 b) wies er eine Bindung oder Umwandlung des Alkohols im Darmkanal, eine veränderte Verteilung desselben im Organismus oder eine durch die Aminosäure induzierte schnellere Oxydation zu Kohlensäure und Wasser als unwahrscheinlich zurück und wiederholte seine Auffassung, daß Alkohol mit Aminosäuren eine Verbindung eingehe.

Die von WIDMARK vorgenommene Deutung seiner Versuchsergebnisse mit Aminosäuren ist aber nur dann zulässig, wenn die von ihm angegebenen Konstanten ihre Bedeutung behalten und ihre Konstanz außer Zweifel steht. Die Abbaugeschwindigkeit des Alkohols wurde von WIDMARK als Reaktion nullter Ordnung nach Arrhenius angesehen, also als eine von der Menge des umzusetzenden Alkohols unabhängige Konstante β.

Nun konnten aber FREUDENBERG und MALLACH (1966) in einer statistischen Auswertung von 55 Trinkversuchen bei alimentärer Nüchternheit und Körperruhe der Probanden eine ziemlich straffe positive Korrelation zwischen c_o und β und daraus folgend, eine negative zwischen c_o und r darstellen. Sie fanden weiterhin bei einem Durchschnittswert $\bar{r}$ von 0,710 eine Standardabweichung von 0,0904. Dieser große Wert ist neben der biologischen Streuung methodisch bedingt, d.h. der konstante Wert von β ist nur eine Fiktion, der die Wirklichkeit in einem begrenzten Verlaufsstück mehr oder weniger nahekommt. Der von ihnen errechnete Wert der Standardabweichung (0,0904) kommt dem nach WIDMARK angegebenen sehr nahe, und damit lassen sich auch aus den WIDMARK'schen Zahlen Werte, die $r = 1$ nahekommen oder sogar größer sind als 1, voraussagen. Solche Werte sind aber, selbst wenn sie etwas kleiner als 1 sind, mit dem Begriff einer reduzierten Körpermasse nicht mehr vereinbar.

Obwohl also gewisse Bedenken gegenüber der WIDMARK'schen Theorie bestehen, ist jedoch die Annahme eines Alkoholdefizits nicht von der Hand zu weisen. Allerdings sind die ursprünglich geäußerten Ansichten mit Vorbehalt zu betrachten. GRAF und FLAKE (1933) hatten Verteilungskonstanten von 0,9, 1,0 1,22 und darüber errechnet, Werte, die bei richtiger Bestimmung von β physiologisch nicht zu deuten wären und zu der Annahme einer Verminderung der im Organismus vorhandenen Alkoholmenge zwänge. MAYER (1936) fand ebenfalls ein Alkoholdefizit, läßt die Deutung dieser Erscheinung jedoch offen. Er diskutiert sowohl eine Speicherung des Alkohols als auch eine Ausscheidung durch den Darm mit oder ohne Umwandlung in eine andere chemische Verbindung.

HERBRICH und PROKOP (1963) bestimmten das Alkoholdefizit bei gleichzeitiger Nahrungs- und Alkoholaufnahme auf 33,8% der Maximal- und 36,8% der Durchschnittswerte im Vergleich zu den Nüchternwerten. Die Art der Nahrung wird von den Autoren nicht mitgeteilt. Als Hauptursache sehen sie einen Resorptionsverlust an, halten jedoch eine chemische Umwandlung nichtoxydativer Natur im Sinne WIDMARK's für möglich. Daneben werden

noch eine Verminderung der β-Werte durch vermehrten Abbau im intermediären Stoffwechsel oder eine vermehrte Ausscheidung in Schweiß, Atemluft und Harn und schließlich eine Änderung des Faktors r diskutiert. PROKOP (1963) bezieht sich in einer anderen Arbeit auf dieselben Untersuchungen; er teilt hier zur Zusammensetzung der Nahrung ein Verhältnis von Kohlenhydrate : Fett : Eiweiß = 4 : 1 : 1 (g/g) mit. Unter der Hypothese einer verzögerten oder verminderten Resorption errechnete er mit steigender Kalorienzufuhr eine Senkung der Abbauwerte β in den ersten 90 Minuten nach dem Kurvenmaximum auf Werte z.T. unter 0,05‰. Ein Beweis für die Richtigkeit dieser Hypothese findet sich aber auch in diesen Arbeiten nicht. Wie von FREUDENBERG und MALLACH dargestellt, lassen die von diesen Autoren berechneten Werte für r keine ausreichende Beurteilung der Alkoholverteilung im Organismus zu.

Eindrucksvolle Untersuchungen zum Alkoholdefizit teilt auch ELBEL (1937, 1956) mit, der, zumindest als Teilfaktor, die von WIDMARK vermutete Esterbildung für durchaus plausibel hält.

II. DIE VORAUSSETZUNGEN ZUR BILDUNG VON AMINOSÄURE-AETHYLESTERN IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS

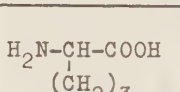
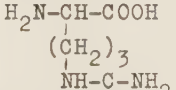
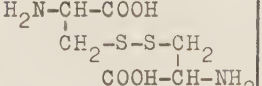
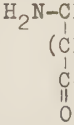
1. MENGE UND VERTEILUNG DER AMINOSÄUREN

Im Hinblick auf eine zu erwartende Esterbildung sind Menge und Verteilung der Aminosäuren im Organismus von besonderem Interesse. Der überwiegende Teil des oral gegebenen Eiweißes wird bis zu den Aminosäuren aufgespalten, und diese werden fast vollständig durch die Darmschleimhaut resorbiert, so daß freie Aminosäuren die Transportform des Eiweißes darstellen. Bis heute sind etwa 250 teils im Eiweiß und in den Körperflüssigkeiten gefundene, teils im Laboratorium synthetisierte Aminosäuren bekannt, von denen aber nur etwa 20 regelmäßig im menschlichen Organismus gefunden werden. Diese Aminosäuren und ihre wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

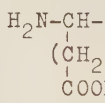
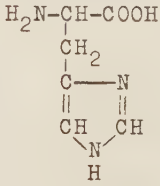
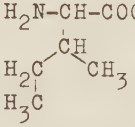
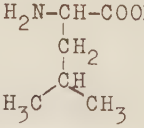
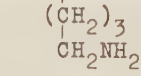
Für die Esterbindung ist eine freie Carboxylgruppe Voraussetzung; sie darf also weder in peptidartiger noch in anderer Form gebunden sein. Die Nüchternspiegel freier Aminosäuren im Serum und in anderen Körpersäften sind häufig bestimmt worde. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse mehrerer Untersucher zeigt Tabelle 2. Die Differenzen der Grenz- und Durchschnittswerte der einzelnen Bestimmungen werden von einigen Autoren, so von CHRISTENSEN und LYNCH (1946), OEPEN und OEPEN (1963) und von BERGER, ANTENER, BRECHBÜHLER und STALDER (1964) auf die Unterschiede in der Eiweißfällung und den Nachweismethoden zurückgeführt. Hierauf wird später einzugehen sein.

Tabelle 1

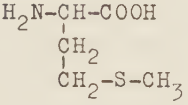
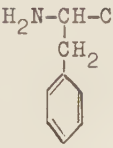
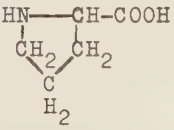
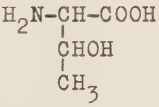
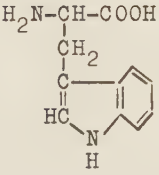
Die regelmäßig im menschlichen Organismus erscheinenden Aminosäuren und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften

Aminosäure	Strukturformel	Summenformel	Mol.Gewicht Reaktion
Alanin		$C_3H_7O_2N$	89,10 neutral
Arginin		$C_6H_{14}O_2N_4$	174,21 basisch
Asparaginsäure		$C_4H_7O_4N$	133,11 sauer
Citrullin		$C_6H_{13}O_3N_3$	175,19 neutral
Cystin		$C_6H_{12}O_4N_2S_2$	240,31 neutral
Glutamin		$C_5H_{10}O_3N_2$	146,15 neutral

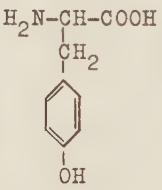
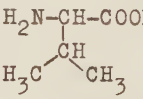
Fortsetzung der Tabelle 1

Aminosäure	Strukturformel	Summenformel	Mol.Gewicht Reaktion
Glutaminsäure		$C_5H_9O_4N$	147,14 sauer
Glycin		$C_2H_5O_2N$	75,07 neutral
Histidin		$C_6H_9O_2N_3$	155,16 basisch
Isoleucin		$C_6H_{13}O_2N$	131,18 neutral
Leucin		$C_6H_{13}O_2N$	131,18 neutral
Lysin		$C_6H_{14}O_2N_2$	146,19 basisch

Fortsetzung der Tabelle 1

Aminosäure	Strukturformel	Summenformel	Mol.Gewicht Reaktion
Methionin		$C_5H_{11}O_2N\,S$	149,22 neutral
Phenylalanin		$C_9H_{11}O_2N$	165,20 neutral
Prolin		$C_5H_9O_2N$	115,14 neutral
Threonin		$C_4H_9O_3N$	119,12 neutral
Tryptophan		$C_{11}H_{12}O_2N_2$	204,23 neutral

Fortsetzung der Tabelle 1

Aminosäure	Strukturformel	Summenformel	Mol.gewicht Reaktion
Tyrosin		$C_9H_{11}O_3N$	181,20 neutral
Valin		$C_5H_{11}O_2N$	117,15 neutral

Autoren / Aminosäure	1	2	3	4	5		6		7	
Alanin	.	6,5 - 10,9	.	.	.	.	2,8 - 4,1	3,3	2,57 - 5,37	3,97
Arginin	2,3	5,8 - 7,8	2,5	1,6	1,22 - 1,93	.	0,9 - 2,2	1,4	1,10 - 3,58	2,34
Asparaginsäure	.	0,7 - 0,9	.	.	0,01 - 0,07	0,03	0,6 - 1,5	1,0	.	0,58
Citrullin	.	.	.	.	.	.	.	.	0,38 - 0,59	0,50
Cystin	.	1,0 - 1,1	2,0	1,5	1,08 - 1,30	1,18	0,8 - 1,2	1,0	0,89 - 2,05	1,47
Glutamin	.	.	.	.	.	.	.	.	2,68 - 8,88	5,78
Glutaminsäure	.	10,9 - 20,3	.	.	0,43 - 1,15	0,70	1,1 - 3,8	2,4	0,63 - 6,19	3,41
Glycin	.	3,9 - 7,7	.	.	1,34 - 1,73	1,54	0,5 - 2,0	1,3	1,25 - 2,29	1,77
Histidin	1,4	1,6 - 1,8	1,0	.	0,79 - 1,48	1,15	1,3 - 3,1	1,9	1,06 - 1,78	1,42
Isoleucin	1,7	0,4 - 1,4	1,5	1,3	0,69 - 1,28	0,89	0,5 - 1,0	0,7	0,98 - 2,22	1,60
Leucin	2,0	1,2 - 1,5	2,0	1,9	1,42 - 2,30	1,69	1,6 - 4,2	2,5	1,23 - 2,59	1,91
Lysin	3,0	8,1 - 13,1	2,8	2,2	2,51 - 3,02	2,72	0,9 - 3,0	1,9	2,11 - 3,79	2,95
Methionin	.	0,1 - 0,3	0,29	0,52	0,33 - 0,43	0,38	0,5 - 1,1	0,8	0,46 - 1,48	0,85
Phenylalanin	1,4	0,8 - 1,5	.	.	0,69 - 0,95	0,84	0,8 - 2,4	1,4	0,74 - 2,02	1,38
Prolin	.	1,7 - 3,0	.	.	1,84 - 3,34	2,36	1,3 - 2,9	2,0	.	.
Threonin	2,1	1,7 - 3,2	.	1,7	1,21 - 1,72	1,39	0,6 - 1,5	1,1	1,12 - 2,92	2,02
Tryptophan	1,1	0,5 - 0,7	.	1,3	.	.	1,0 - 3,5	1,5	0,66 - 1,50	1,08
Tyrosin	1,5	0,6 - 1,1	.	1,0	0,81 - 1,45	1,03	0,7 - 2,1	1,1	0,74 - 2,22	1,48
Valin	2,9	3,5 - 7,5	3,0	2,7	2,37 - 3,71	2,88	2,6 - 4,2	3,2	2,15 - 3,51	2,83

Tabelle 2: Der Zahlenschlüssel in der Kopfzeile ergibt sich aus Tabelle 3

Tabelle 3

Zahlenschlüssel zu Tabelle 2

1	HIER and BERGEIM	(1946)
2	WISS	(1948)
3	SCHREIER und PLÜCKTHUN	(1950)
4	JOHNSON and BERGEIM	(1951)
5	STEIN and MOORE	(1954)
6	MÜTING	(1958)
7	DOCUMENTA GEIGY	(1960)

MÜTING (1958) bestimmte die Konzentrationen freier Aminosäuren im Magen- und Duodenalsaft (Tabelle 4). Da eine Säure als Protondonator die Esterbildung katalysiert, könnten die hier vorgefundenen Aminosäuren im Hinblick auf die saure Reaktion des Magensaftes von Bedeutung sein. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Resorption freier Aminosäuren (und möglicherweise deren Aethylester) aus dem Magen. Ihr Auftreten in den Magenvenen wurde in neuerer Zeit von BRAMSTEDT (1955) nachgewiesen. Bereits TSCHEKUNOW (1913) fand bei Hunden eine geringe Resorption von Aminosäuren und Peptonen aus dem Magen.

Im Hinblick auf die von MAYER (1936) diskutierte chemische Bindung und Ausscheidung des Alkohols im Magen-Darmtrakt wäre noch die Menge der freien Aminosäuren in den Faeces von Interesse. Im Schrifttum finden sich hierzu lediglich die Untersuchungen von SHEFFNER, KIRSNER und PALMER (1950). Ihre Analysenwerte zeigt Tabelle 5.
Da die Aminosäureausscheidung im Urin für das vorliegende Problem ohne Bedeutung ist, soll hierauf nicht weiter eingegangen werden.

Da also der größte Teil der durch Eiweißaufspaltung freigesetzten oder in freier Form zugeführten Aminosäuren in den weiteren Transportwegen über die Pfortader erscheint - die Lymphbahnen sind nach ABDERHALDEN und LONDON (1926) nur in ganz geringem Maße beteiligt - erhält die Meinung WIDMARK's Gewicht, daß als Orte einer Esterbildung das Darmepithel oder die Leber besonders in Frage kommen (WIDMARK 1933 a).

Tabelle 4

Aminosäuregehalt des Magen- und Duodenalsaftes in mg %

N = Zahl der untersuchten Personen

1 = Nüchternsaft

2 = Reizsaft nach Coffein

Aminosäure	normacid (N=15)		anacid (N=10)		superacid (N=10)		Duodenal-saft (N=15)
	1	2	1	2	1	2	1
Asparaginsäure	1,7	1,6	1,9	1,8	2,3	2,5	3,0
Glutaminsäure	2,0	4,7	3,2	2,6	2,4	2,7	2,2
Lysin	1,4	1,3	1,8	1,5	1,8	1,6	2,2
Arginin	3,3	3,7	3,3	3,5	3,6	5,0	2,9
Histidin	1,3	1,6	1,4	1,3	2,0	1,8	1,2
Tyrosin	1,0	0,9	1,0	1,2	1,1	1,3	0,5
Tryptophan	1,9	1,3	1,8	1,9	1,4	1,2	1,1
Phenylalanin	0,8	1,1	1,2	0,7	1,8	1,6	1,7
Prolin	3,2	2,8	1,7	3,3	2,5	2,2	3,0
Cystin	1,8	1,6	1,8	3,0	3,7	4,4	4,5
Methionin	0,9	0,9	0,8	1,9	1,5	1,6	2,0
Leucin	1,9	1,2	1,2	1,8	2,2	3,3	1,2
Isoleucin	0,7	1,0	0,8	1,0	1,4	1,6	1,1
Valin	2,3	2,3	1,1	2,5	2,1	2,5	1,9
Glycin	1,3	1,2	1,4	1,4	1,6	2,1	1,7
Alanin	2,7	2,6	1,8	2,3	1,9	2,0	3,1
Serin	1,6	2,1	2,3	1,9	2,3	2,1	2,0
Threonin	1,8	2,0	2,5	2,0	1,5	2,0	1,8
Summe	31,6	33,9	31,0	35,6	37,1	41,5	37,1
α-Amino-N	5,6	7,2	6,2	8,0	8,4	14,4	9,2

Aminosäure	Fleisch, Eier	Magermilch	Proteinhydrolysat (Leber)	Kondensmilch
Lysin	150	363	484	379
Arginin	58	160	314	326
Histidin	70	84	130	129
Methionin	20	56	203	103
Leucin	161	235	337	349
Isoleucin	105	226	258	196
Valin	170	316	290	336
Threonin	150	231	292	257
Summe	884	1671	2308	2075
Stickstoff	524	840	1103	995

Tabelle 5

Aminosäuregehalt der Faeces bei Zufuhr verschiedener Proteine gleichen Stickstoff-, Fett-, Kohlenhydrat- und Kaloriengehaltes in $mg/cm^3/24h$

2. RESORPTIONSVERHALTEN DER AMINOSAUREN

Zur Bestimmung des Aminosäurespiegels im Blut und in den Geweben sind zahlreiche Untersuchungen unter wechselnden Belastungsbedingungen ausgeführt worden. Die Ergebnisse der Tierversuche sind jedoch nur bedingt auf menschliche Resorptionsverhältnisse übertragbar. Nach Arbeiten von van SLYKE und MEYER (1912, 1913 a, b und c) an Hunden wandern die Aminosäuren nach Resorption sehr rasch in das Gewebe ein und erreichen hier vorübergehend eine wesentlich höhere Konzentration als im Blut. Nach etwa drei Stunden sinkt der Aminosäuregehalt des Gewebes wieder auf den normalen Wert ab. VIOLLIER und GEISSBERGER (1947) konnten eine längerdauernde Speicherung von Aminosäuren weder im Blut noch im Gewebe nachweisen. Sofern die Säuren nicht als Gewebsproteine fixiert werden konnten, wurden sie entweder abgebaut oder aus dem Organismus ausgeschieden.

DIRR und LEIS (1940) wiesen sowohl nach intravenöser Tyrosinbelastung beim Kaninchen als auch nach oraler beim Menschen eine Erhöhung des Tyrosinspiegels im Serumfiltrat sofort nach Zufuhr und eine Normalisierung nach 2 1/2 Stunden nach; sie schlossen daraus auf einen schnellen Umbau des Tyrosins in Serumeiweißkörper. CARRIE und STUTTGEN (1950) konnten vor Injektion von 250 mg L-Tyrosin (in 40 ml aqua dest. und 0,5 g $NaHCO_3$) bei 8 gesunden Versuchspersonen diese Aminosäure nach der qualitativen Methode von GERNGROSS, VOSS und HERFELD (1933) im Serum nicht sicher nachweisen, jedoch 3 Minuten post injectionem bei 6 Versuchspersonen. Nach 30 Minuten war der Nachweis in allen Fällen nicht mehr möglich.

MÜTING (1958) injizierte 4 gesunden Versuchspersonen Tyrosin intravenös und fand nach 10 Minuten einen Anstieg des Serumtyrosinspiegels von 1,2 auf 2,5 mg%. Der Ausgangswert wurde nach 30 Minuten wieder erreicht. Eine orale Belastung von 5 gesunden Versuchspersonen und 20 Diabetikern mit je 2 g Cystin ergab einen Höhepunkt des Cystingehaltes im Serumfiltrat nach 4 und eine Rückkehr zum Ausgangswert nach 8 Stunden.

Eine Änderung des Cystingehaltes im Serumeiweiß wurde nicht beobachtet. Eine entsprechende Methioninbelastung durch intravenöse Injektion von 2 g D,L-Methionin (Thiomedon^{R}), die an 10 gesunden Versuchspersonen durchgeführt wurde, ist in Abbildung 1 dargestellt. Danach ist der Methioningehalt des enteiweißten Serums noch 2 Stunden nach Zufuhr erhöht; erst nach 4 Stunden erreicht er wieder den Ausgangswert.

SCHREIER und BERGMANN (1951) spezialisierten ihre Untersuchungen auf Alanin und fanden nach Belastung mit 50 g Casein oder Fleischeiweiß einen hohen Anstieg der Alaninkonzentration im Serum. Bei Casein erfolgte der Abfall auf den Normwert binnen 3 1/2 Stunden, bei Fleischeiweiß wesentlich langsamer. Hier war der Ausgangswert bei Ende der Beobachtungszeit (= 3 1/2 Stunden) noch nicht wieder erreicht (Abbildung 2). Nach oraler Gabe von 10 g Alanin fanden sich in der ersten halben Stunde Anstiege bis zum 10fachen des Normwertes bei starken individuellen Variationen (Abbildung 3). Von 10 g Alanin wurden in 3 Stunden 1,3 g (= 13%) im Urin ausgeschieden.

HIMWICH (1954) untersuchte bei 20 Probanden den Glutaminsäure-Glutaminspiegel im Serum und sein Verhalten bei Belastung. Er fand eine auffallende Konstanz der Nüchternwerte unabhängig davon, ob eine glutaminfreie Scheinarznei oder eine Woche lang täglich je 15 g, eine zweite Woche lang täglich je 30 g oder weitere 10 Wochen täglich je 45 g zur Hälfte mit Bicarbonat neutralisierter Glutaminsäure gegeben wurden. Das Verhalten des Glutaminsäurespiegels unmittelbar nach Gabe der Aminosäure zeigte charakteristische Unterschiede, die in Abbildung 4 dargestellt sind. Die Kurve A entspricht dem Konzentrationsverlauf bei 2 Probanden mit starker Nausea bei Glutaminbelastung, Kurve B bei Rekonvaleszenten nach einer Gelbsucht; Kurve D wurde bei älteren Anstaltsinsassen in mäßigem AZ gefunden, Kurve C schließlich entspricht gesunden Kontrollpersonen. Die gefundenen Unterschiede im Konzentrationsverhalten werden von HIMWICH als ein Maß dafür angesehen, wie gut der Organismus mit Glutaminsäure versorgt ist.

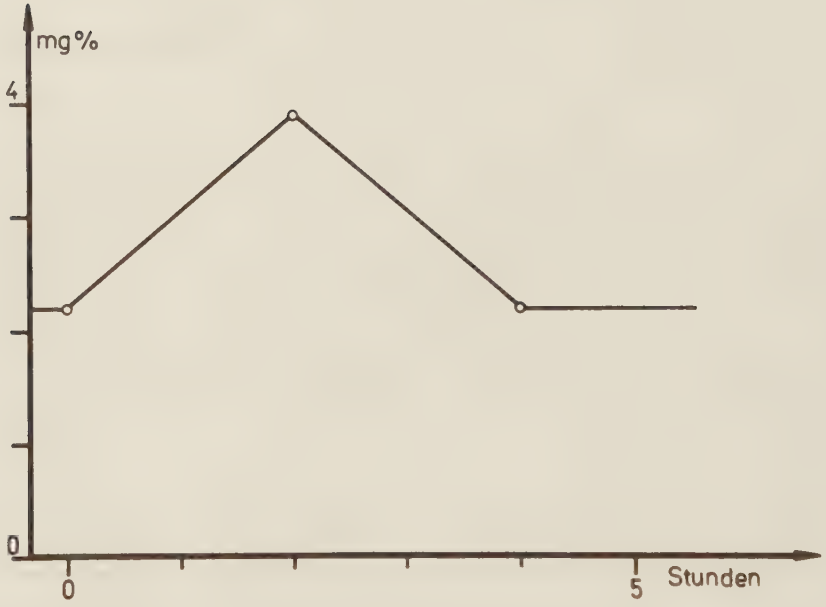


Abbildung 1

Methioninkonzentration im Serum nach intravenöser Belastung mit 2 g D, L-Methionin (Thiomedon^{R})

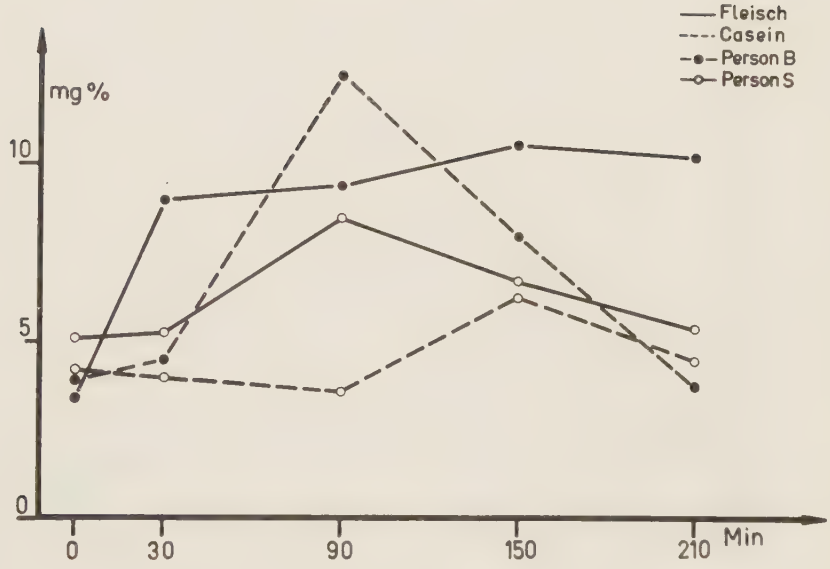


Abbildung 2

Alaninkonzentration im Serum nach oraler Belastung mit 50 g Casein- und Fleischeiweiß

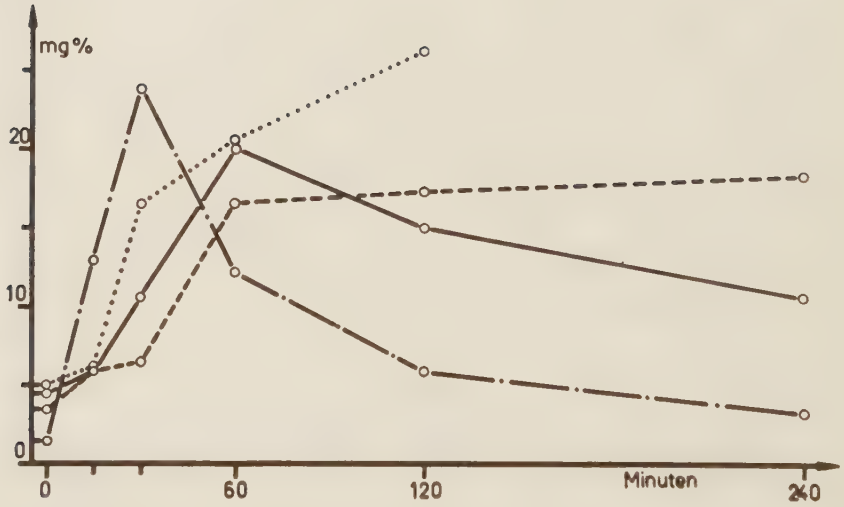


Abbildung 3

Alaninkonzentration im Serum nach oraler Belastung mit 10 g Alanin

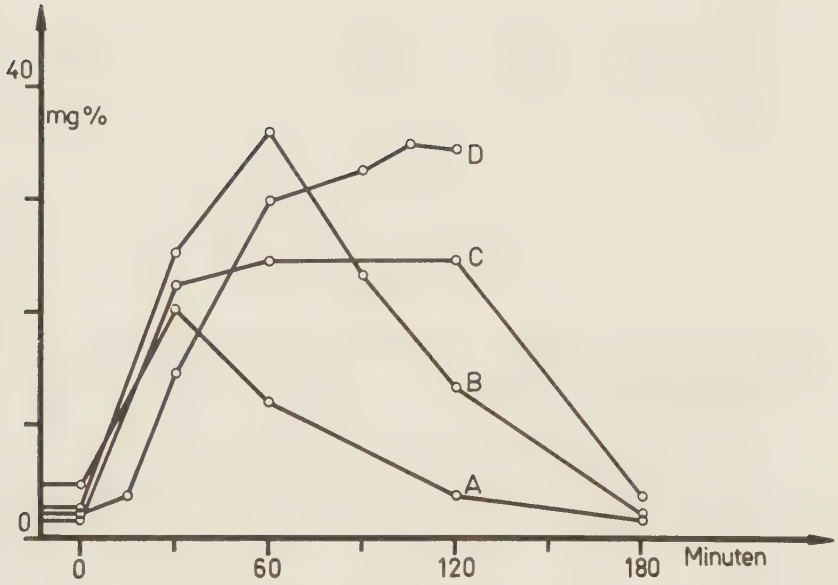


Abbildung 4

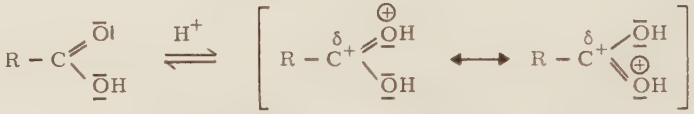
Glutaminsäurekonzentration im Serum nach oraler Belastung mit Glutaminsäure

A Probanden mit starker Nausea bei Glutaminsäurebelastung
B Rekonvaleszenten nach einer Gelbsucht
C gesunde Kontrollpersonen
D ältere Anstaltsinsassen in mäßigem AZ

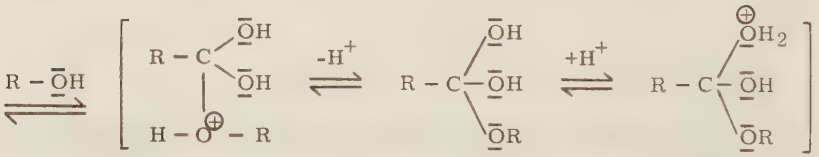
3. BILDUNG DER AMINOSÄURE-AETHYLESTER

Die Bildung eines Esters aus einem Alkohol und einer Carbonsäure (z.B. Aethanol und Aminosäure) verläuft in vitro auf folgende Weise (BEYER, 1966).

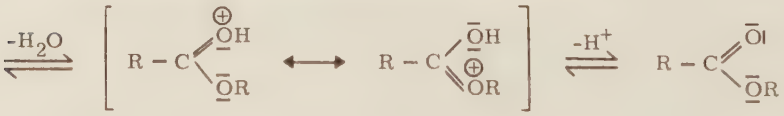
Ein Proton wird an die Carbonylfunktion der Carboxylgruppe addiert, und es entsteht ein mesomeriestabilisiertes Kation, dessen C-Atom dadurch positiviert wird.



An dieses C-Atom tritt als nukleophiler Reaktionspartner das O-Atom der alkoholischen OH-Gruppe:



Da nach der Erlenmeyer-Regel zwei OH-Gruppen an einem C-Atom nicht existenzfähig sind, wird aus dieser Form unter Abspaltung von Wasser und eines Protons der Ester gebildet:



Das anfänglich aufgenommene und die Reaktion katalysierende Proton wird also in der letzten Stufe wieder frei, so daß der Katalysator erhalten bleibt. Durch Isotopenmarkierung konnte gezeigt werden, daß das Wassermolekül aus der OH-Gruppe der Säure und aus dem Proton der alkoholischen OH-Gruppe entsteht. Auf den andersartigen Verlauf der Esterbildung mit tertiären Alkoholen braucht in diesem Zusammenhang nicht eingegangen zu werden.

Die Esterbildung ist eine Gleichgewichtsreaktion und unterliegt dem Massenwirkungsgesetz. Die rasche Einstellung des Gleichgewichts wird gefördert durch Erhöhung der Temperatur (die hier als Körpertemperatur festliegt) und der H^+-Ionenkonzentration, und zwar ist die Veresterungsgeschwindigkeit der H^+-Ionenkonzentration direkt proportional. Für die Gleichgewichtskonstante K gilt analog zu allen chemischen Gleichgewichten:

$$K = \frac{[\text{Ester}] \cdot [\text{Wasser}]}{[\text{Säure}] \cdot [\text{Alkohol}]} \quad \text{mithin auch}$$

$$[\text{Ester}] = K \cdot \frac{[\text{Säure}] \cdot [\text{Alkohol}]}{[\text{Wasser}]}$$

Es entsteht also umso mehr Ester, je höher die Säure- oder die Alkoholkonzentration oder die beider Reaktionspartner ist. Bei dieser Betrachtungsweise müßte also sowohl bei vermehrter Nahrungszufuhr, als auch bei gesteigerter Alkoholgabe die Menge des zugeführten Alkohls, die nicht als solcher im Organismus nachweisbar ist, also das Alkoholdefizit, zunehmen. Hierauf wird später einzugehen sein.

Die Esterbildung verläuft in vitro auch bei Körpertemperatur sehr langsam. Im Organismus muß jedoch eine enzymatische Katalyse dieser Reaktion erwartet werden. Die Lage des Gleichgewichtes wird hierdurch aber nicht verschoben, sondern lediglich die Einstellung desselben - und zwar von beiden Seiten her - beschleunigt. Untersuchungen hinsichtlich einer enzymatisch katalysierten Reaktion der Aminosäuren mit Aethanol und der hierbei möglicherweise beteiligten Fermente liegen nicht vor, da es sich um eine nicht physiologisch im Organismus gebildete Substanz handelt. Aus diesem Grunde sind auch keine spezifisch wirkenden Fermente zu erwarten. Eine Katalyse durch unspezifisch wirkende Enzyme in beiden Richtungen ist jedoch durchaus möglich, eine Aufspaltung anderer Aminosäureester durch unspezifische Proteasen ist bekannt.

Die Frage, ob unter den Aminosäuren einige stärker als andere zur Esterbildung neigen, ist von mehreren Autoren für Verhältnisse in vitro übereinstimmend beantwortet worden. So fanden HEYNS, KOCH und KÖNIGSDORF (1952) bei papierchromatographischer Entwicklung von in salzsaurer Lösung aufgetragener Glutaminsäure in mit Wasser gesättigtem Butanol/Eisessig (4:1) neben dem Glutaminsäurefleck zwei weitere ninhydrinpositive Substanzen, deren eine sie als γ-Butylester identifizierten, der sich beim ersten Überschreiten der Startzone unter dem Einfluß der bei Nachtrocknung des Lösungsmittels noch vorhandenen Salzsäure gebildet hatte. Die zweite, auf dem Startfleck zurückgebliebene Substanz wurde als Ester der Glutaminsäure und Zellulose aufgefaßt. Die Autoren heben die sehr leichte Veresterbarkeit der γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure hervor.

KOCH und HANSON (1953) überprüften Lösungen von Glutaminsäure und Asparaginsäure in einem Gemisch von Aethanol und nHCl (75:25, v/v). Sie fanden nach mehrtägigem Stehenlassen der Glutaminsäurelösung bei Zimmertemperatur neben der Glutaminsäure deren γ-Aethylester, sowie dessen Hydrochlorid. In der Asparaginsaurelösung war erst nach mehrwöchigem Stehenlassen das Hydrochlorid des Asparaginsäure-β-aethylesters nachweisbar, nicht jedoch die hydrochloridfreie Substanz.

De VAY, WEINHOLD und ZWEIG (1959) lösten die in der Regel im Organismus vorkommenden Aminosäuren in 70%igem Aethanol und 10%igem 2-Propanol und stellten diese Lösungen mit Salzsäure und Natriumhydroxyd auf unterschiedliche pH-Werte ein. Nach papierchromatographischer Auftrennung in Phenol/Wasser unmittelbar nach Ansetzen der Lösungen fanden sie bei pH-Werten zwischen 1,5 und 3 sowohl in der Glutaminsäure- als auch in der Asparaginsäurelösung jeweils eine weitere Substanz; diese trat quantitativ umso stärker auf, je größer das pH der Lösung wurde. Nach Stehenlassen der Lösungen bis zu 36 Stunden zeigten sich auch bei β-Alanin und bei γ-Aminobuttersäure Doppelflecke. Diese neuen Substanzen konnten als die Monoaethylester der jeweiligen Säuren identifiziert werden. Eine Veresterung mit 2-Propanol wurde nicht beobachtet. Alle anderen Aminosäuren bildeten weder in Aethanol- noch in 2-Propanollösung Doppelflecke (auch nicht nach mehrwöchigem Stehenlassen).

ZWEIG (1959) bestätigte diese Ergebnisse, indem er die neugebildeten Substanzen durch Infrarotspektroskopie, Äthoxy-Gruppenbestimmung und Elementar-Analyse als Aminosäure-monoaethylester identifizierte. Auf Grund dieser Ergebnisse liegt der Schluß nahe, daß die Bildung des Glutamin- und Asparaginsäure-aethylesters die geringste Aktivierungsenergie erfordert und auch in einer unspezifisch katalysierten Reaktion bevorzugt wird.

III. HINWEISE IM SCHRIFTTUM ZUR CHROMATOGRAPHISCHEN AUFTRENNUNG DER AMINOSÄUREN UND IHRER ESTER

1. TRENNUNG DER SÄUREN UND ESTER

Zum Nachweis und zur Identifikation der Aminosäuren bieten sich vor allem drei Verfahren an: Die Auftrennung an Ionenaustauschersäulen, die Papier- und die Dünnschichtchromatographie. Schließlich können Aminosäurederivate, vor allem Ester, gaschromatographisch nachgewiesen werden. Zunächst sollen aber die drei gebräuchlichsten Verfahren besprochen werden.

Die Auftrennung an Ionenaustauschersäulen liefert zwar die exaktesten Ergebnisse, erfordert aber entweder die Bestimmung mehrerer hundert Einzelfraktionen oder aber eine automatisch arbeitende Apparatur, wie sie im Prinzip zuerst von SPACKMAN, STEIN und MOORE (1958) angegeben worden ist. Die Papierchromatographie ist mit geringem Aufwand durchzuführen, benötigt jedoch sehr viel Zeit (etwa 24 Stunden pro Laufrichtung) und ist sowohl im Hinblick auf die untere Nachweisbarkeitsgrenze, als auch auf die Güte der Auftrennung der Dünnschichtchromatographie unterlegen. Das letztere Verfahren ermöglicht bei geringem Zeitaufwand Trennung und Nachweis aller gewöhnlich vorkommenden Aminosäuren in Mengen von 0,006 µg für Glycin bis 0,5 µg für Histidin (FAHMY, NIEDERWIESER, PATAKI und BRENNER (1961).

Alle genannten Verfahren können heute als Standardverfahren angesehen werden, so daß zu ihrer Geschichte und Theorie auf die Monographien über die Anwendung von Ionenaustauschern von BAILEY (1962), DORFNER (1964) und INCZEDY (1964), von CRAMER (1962) und HAIS und MACEK

(1963) über die Papierchromatographie sowie von RANDERATH (1962), PATAKI (1966) und STAHL (1967) über die Dünnschichtchromatographie verwiesen werden kann. Auch vollständige Literaturübersichten finden sich in den genannten Monographien. Eine Zusammenstellung der unteren Nachweisbarkeitsgrenzen der häufigsten Aminosäuren aus dem Schrifttum ist in Tabelle 6 gegeben (FAMY, NIEDERWIESER, PATAKI und BRENNER, 1961). Die Abkürzungen der einzelnen Aminosäuren entsprechen der üblichen Nomenklatur.

Aminosäure	µg	Aminosäure	µg
Ala	0,05	Lys	0,03
β-Ala	0,06	Met	0,4
Arg	0,06	Phe	0,2
Asp	0,1	Pro	0,5
Glu	0,2	Ser	0,1
Gly	0,006	Thr	0,1
His	0,5	Try	0,5
Leu	0,2	Tyr	0,1
		Val	0,2

Tabelle 6

Untere Nachweisbarkeitsgrenzen nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G in µg für die häufigsten Aminosäuren.

2. SERUMAUFBEREITUNG

Die gebräuchlichen dünnschichtchromatographischen Trennverfahren erfordern eine vollständige Abtrennung von Eiweiß und Lipoiden sowie eine weitgehende von anorganischen Salzen aus dem Serum.

a) Entfernung des Eiweißes

Das bisher gebräuchlichste Verfahren ist die Enteiweißung durch Säurefällung. Es erscheint jedoch für die vorliegenden Zwecke ungeeignet, da infolge der pH-Erhöhung eine artifizielle Esterbildung mit bei späteren Untersuchungen anwesendem Serumalkohol möglich erscheint. Auch erwies sich bei eigenen Untersuchungen eine schonende, vollständige Entfernung der Säure als schwierig. So entstanden unter dem Einfluß der restlichen Säure bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Aminosäuren mit dem Fließmittel 6 (Butanol/Ameisensäure/Wasser) Aminosäurebutyl-ester. Hierüber berichten auch HEYNS, KOCH und KÖNIGSDORF (1952).

Die Eiweißfällung mit Alkohol-Acetongemischen wurde von JIRGEL (1959) untersucht. Er verwendete Aethanol/Aceton (7 : 3 v/v) in einem Verhältnis von 9 : 1 zur Serummenge und trennte nach der Eiweißfällung die Aminosäuren in einer Dimension elektrophoretisch und in der anderen chromatographisch. Auf diese Weise erfolgt die Entsalzung elektrophoretisch. HUBL und BÜCHNER (1965) fällten mit Methanol/Aceton (3 : 1) und setzten das Gemisch dem Serum im Verhältnis 2 : 1 zu. Obwohl diese Gemische für die nachfolgende Dünnschichtchromatographie geeignet sind, wurden sie im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht verwendet, da bei späteren Versuchen nach Alkoholgenuß unter gleichzeitiger Zufuhr von Eiweiß oder freien Aminosäuren die Frage nicht sicher zu beurteilen wäre, ob möglicherweise nachgewiesene Ester im Organismus oder später artifiziell entstanden sind. Auch eine Umesterung entstandener Ester mit Methanol käme in Frage.

KNAUFF, DIETERLE und ZICKGRAF (1959) verwenden zur Eiweißfällung vorgekühltes Aceton; sie enteiweißen durch etwa halbstündiges Stehenlassen in der Kälte. Ebenso arbeiten KNAUFF, SELMAIR und REITLINGER (1960), die dem Serum die vierfache Menge vorgekühlten Acetons zusetzen und nach 30 Minuten in einer Kühlzentrifuge abzentrifugieren. Auch KNAUFF und SCHABERT (1960) verwenden diese Methode, waschen aber zusätzlich

den Niederschlag mit salzsaurem Aceton. PATAKI und KELLER (1963 a und b) halten zur Enteiweißung des Serums die doppelte Menge (a) und zur Enteiweißung von menschlichem Sperma (b) die einfache Menge Aceton für ausreichend. Bei Eiweißfällung mit Aceton wird neben dem Eiweiß auch ein großer Teil der anorganischen Salze und der Kohlenhydrate entfernt.

Eine Entfernung des Eiweißes gelingt außer mit Fällungsmethoden auch durch Dialyse. Ein besonders elegantes Verfahren stellt die Sephadex-Gelfiltration dar (PORATH, 1960; STEPANOV, HANDSCHUH und ANDERER, 1961; FLODIN, 1961; DETERMANN, 1964), eine moderne Methode, die zunehmend Eingang findet und auch die Abtrennung kleiner Peptide von Aminosäuren ermöglicht.
Die Enteiweißung in der Ultrazentrifuge ist möglich, aber wegen des hohen apparativen Aufwandes ungebräuchlich.

b) Entfernung der Lipoide

Substanzen mit Lipoidcharakter verursachen ein Zerfließen und Ineinanderlaufen der Substanzflecke. Zu ihrer Entfernung kann auf die bekannten Verteilungsverfahren zurückgegriffen werden, also auf die Ausschüttelung einer wäßrigen, lipophoben in einer lipophilen Phase.
So bringen KNAUFF, SELMAIR und REITLINGER (1960) die nach Austreibung des zur Eiweißfällung verwendeten Acetons verbleibende Lösung mit Wasser auf das Doppelte des Volumens und schütteln mehrmals mit Aether aus. KNAUFF und SCHABERT (1960) schreiben fünfmaliges Extrahieren mit der doppelten Menge Aether vor. GEROK (1960) hält drei- bis viermaliges Ausschütteln der Lösung mit Aether im Verhältnis 3 : 2 für ausreichend. Die enteiweißte Lösung kann nach HAIS und MACEK (1963) auch zur Trockne eingedampft und diese mit Aether oder Petrolaether aufgenommen werden. Bei allen diesen Verfahren treten jedoch Verluste auf.
WYNN und WILLIAMS (1950) vermuten eine Vermittlung der Löslichkeit von Aminosäuren in der lipophilen Phase durch Phosphatide. AWAPARA (1948) verwendete zur Entfettung Chloroform. Eigene Versuche mit Essig-

säure-aethyl-ester brachten gute Ergebnisse; sie wurden jedoch von den mit Chloroform erzielten Resultaten übertroffen.

c) Entfernung der Salze

Die nach Eiweißfällung und Lipoidextraktion verbleibende Lösung enthält eine wechselnde Menge anorganischer Salze, die in der Regel einem Vielfachen der Aminosäuremenge entspricht. Die höchste, zulässige relative Salzmenge liegt je nach Bedingungen für die Papierchromatographie zwischen dem Zwei- und dem Fünffachen und für die Dünnschichtchromatographie bei etwa dem Zweifachen der Gesamtmenge an Aminosäuren.

CONSDEN, GORDON und MARTIN (1947) entwickelten eine in älteren Untersuchungen viel verwendete Elektrodialyse-Apparatur. Bei elektrolytischer Entsalzung wird allerdings Arginin zum Teil in Ornithin umgewandelt. Histidin, Lysin, Methionin, Prolin und Tyrosin gehen zu 10 bis 30% verloren.

Am häufigsten werden Ionenaustauscher angewendet. DRÈZE und DE BOECK (1952) und DRÈZE, MOORE und BIGWOOD (1954) empfehlen eine Kombination von Anionen- und Kationenaustauschern. HARRIS, TIGANE und HANES (1961) geben ein Verfahren an, das mit Hilfe eines Ionenaustauschers die gleichzeitige Entfernung von Salzen, Proteinen und Kohlenhydraten erlaubt. Auch eine Extraktion der Aminosäuren aus dem Abdampfrückstand mit organischen Lösungsmitteln, in denen anorganische Salze unlöslich sind, ist möglich. BOULANGER und BISERTE (1949) verwendeten wasserfreies Aceton mit 1% konz. Salzsäure, VERGHESE, SATYANARAYANA, RAMAKHRISHNAN und KUPPUSWAMY (1957) ein Gemisch von Butanol/ Phenol im Verhältnis 2:3.

d) Anfärbung der Aminosäuren und ihrer Ester

Der Nachweis der Aminosäuren und ihrer Ester erfolgt in der Regel durch Entwicklung eines Farbstoffes mit geeigneten Reagenzien. Die Bestimmung wird durch Reaktionen erleichtert, die die einzelnen Substanzen in spezifischen Farben erscheinen lassen. Diese Verfahren erhöhen die Sicherheit der Bestimmung und erleichtern die Orientierung auf der "Fleckenkarte". Als geeignet erwies sich FOLIN's Reagenz in der Modifikation nach MÜTING (1952). Die Intensität der Farbentwicklung ist jedoch stark von der Temperatur und der Ausführung der Färbung abhängig. Auch ist der Farbstoff nicht eluierbar, so daß die Methode für quantitatives Arbeiten nicht geeignet erscheint. Sie wurde jedoch zur Kontrolle der auf andere Weise angefärbten Auftrennungen angewendet. Weitere für spezifische Färbungen geeignete Methoden finden sich in den genannten Monographien (PATAKI, 1966; STAHL, 1967).

Für quantitatives Arbeiten ist die Anfärbung mit Ninhydrin besonders geeignet. Sie vereinigt große Empfindlichkeit (s. untere Nachweisbarkeitsgrenzen Tab. 6) mit guter Konstanz der Farbentwicklung. Diese Reaktion wurde von PATTON und CHISM (1951) und FAMY, NIEDERWIESER, PATAKI und BRENNER (1961) ohne Modifikation angewendet. In dieser Form ist der entstehende Farbstoff jedoch sehr unbeständig. Auf seine Stabilisierung durch Schwermetallkomplexe soll später eingegangen werden. Auf die Entstehung des Farbstoffes durch Einwirkung von Ammoniak auch ohne Anwesenheit von Aminosäuren wird noch einzugehen sein. Die Bildung der Aminosäurefärbung ist offenbar nicht bei allen Aminosäuren die gleiche, da bei der Anfärbung von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gelbbraune Farbstoffe entstehen, mit den übrigen Aminosäuren jedoch purpurfarbene. Ein polychromatischer Nachweis ähnlich dem mit FOLIN's Reagenz gelingt durch Zufügen von Collidin (BRENNER und NIEDERWIESER, 1960) und erleichtert ebenfalls die Orientierung.

Für quantitative Bestimmungen nach Anfärbung der Aminosäuren oder deren Ester ist hinreichende Beständigkeit des Farbstoffes Bedingung. Eine Stabili-

sierung ist möglich durch Bildung von Schwermetallkomplexen. KAWERAN und WIELAND (1951) bildeten einen roten Kupferkomplex, der beständig ist, solange keine freien Wasserstoffionen oder starke Komplexbildner vorhanden sind. GIRI, RADHAKRISHNAN und VAIDYANATHAN (1952) eluieren den Farbstoff mit einem Gemisch aus 3,8 ml 75%igem Aethanol und 0,2 ml 0,1%igem Kupfer-(II)-sulfat. FISCHER und DÖRFEL (1953) bilden den Kupferkomplex im Papier und eluieren erst anschließend. BARROLIER (1955) verwendete Cadmiumchlorid zur Stabilisierung. Da jedoch die Cl-Ionen die Bildung des Farbstoffes störten, ersetzte er das Chlorid durch Cadmiumacetat (HEILMANN, BARROLIER und WATZKE, 1957).

e) Quantitative Bestimmung der Aminosäuren und ihrer Ester

Die am häufigsten angewendeten quantitativen Bestimmungsmethoden sind der visuelle Vergleich der Fleckengrößen und die kolorimetrische Messung einer durch Elution des Farbflecks erhaltenen Farbstofflösung. Das erstgenannte Verfahren liefert bei Vergleich mit den Fleckenflächen mitgelaufener Substanzen bekannter Mengen halbquantitativ recht gute Ergebnisse (JANECKE und MAASS-GOEBELS, 1960; KLAVEHN und ROCHELMEYER, 1961; WINTERSTEIN und HEGEDÜS, 1960). FISHER, PARSONS und HOLMES (1949) fanden für die Papierchromatographie eine Proportionalität zwischen der Fleckenfläche und dem Logarithmus der Substanzmenge. BRENNER, NIEDERWIESER und PATAKI (1962) untersuchten die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Dünnschichtchromatographie. Mit steigender Substanzmenge nimmt jedoch die Fleckenfläche schneller zu, als dieser Beziehung entspricht. PURDY und TRUTER (1962) gaben eine Linearität zwischen der Quadratwurzel der Fleckenfläche und dem Logarithmus der aufgebrachten Substanzmenge an. Diese Beziehung ist über einen weiten Bereich gültig. Die genaue Bestimmung der Fleckenfläche ist jedoch schwierig. OSWALD und FLÜCK (1964) bestimmten sie mit dem Planimeter. PATAKI (1964) berechnete die relativen Standardabweichungen nach fünfmaligem Umfahren des Fleckes mit dem Planimeter zu

12, 2% und bei Auszählung auf Millimeterpapier zu 11%. Bei eigenen quantitativen Bestimmungen durch Auszählen auf Millimeterpapier wurde diese Genauigkeit nicht erreicht, so daß die Methode zugunsten der kolorimetrischen Bestimmung nach Elution des Farbstoffes fallengelassen wurde.

Die von der Papierchromatographie bekannten Verfahren können ohne Änderungen auch auf die Dünnschichtchromatographie angewendet werden. Beispiele solcher Methoden geben WELLINGTON (1952), GIRI, RADHAKRISHNAN und VAIDYANATHAN (1952), FISCHER und DÖRFEL (1953) sowie BARROLIER (1955, 1961). Das von dem letztgenannten Autor angegebene Verfahren erwies sich als besonders sicher, so daß es für die eigenen quantitativen Untersuchungen herangezogen wurde.

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Es wurde angestrebt, eine Methode zum Nachweis von Aminosäuren und ihren Estern zu entwickeln, die mit den auch in kleineren Laboratorien vorhandenen Hilfsmitteln auskommt und geringer Vorbereitung bedarf.

1. DARSTELLUNG DER AMINOSÄUREN AUS SERUM

Etwa 25 ml Blut werden 2 bis 3 Minuten nach Entnahme zentrifugiert. Vom Serum werden 8 ml abpipettiert, mit dem vierfachen Volumen vorgekühlten Acetons (MERCK, p.A.) versetzt und eine Stunde in der Kälte stehen gelassen. Bei später geplanten Untersuchungen werden weitere 2,5 ml Serum der Alkoholbestimmung zugeführt. Aceton DAB 6 erwies sich als ungeeignet, da es nach dem Abdampfen in der wäßrigen Phase eine kolloidale Trübung hinterließ, die weder gefällt oder abzentrifugiert noch abfiltriert werden konnte, sich jedoch bei der Chromatographie als außerordentlich störend erwies. Nach Fällung mit Aceton pro analysi trat diese Trübung nicht auf.

KNAUFF und Mitarbeiter schreiben die Verwendung einer Kühlzentrifuge vor. Nach eigenen Untersuchungen genügt es aber, die die Lösung enthaltenden Glasbehälter in tiefgekühlte stählerne Kalotten zu bringen und hierin 15 Minuten lang bei 3000 U/min zu zentrifugieren. Der Überstand kann abpipettiert werden; jedoch hat sich auch ein Dekantieren durch Papierfilter als hinreichend erwiesen, da das Sediment als feste Masse in den Glasbehältern zurückbleibt. Das Aceton wird im Rotationsverdampfer bei 30° C und etwa 80 mm Hg abgedampft. Ein zu geringer Druck führt zu starkem Aufschäumen der Lösungen und Verlusten durch das Abdampfrohr.

Nach Austreiben des Acetons wird bei 45° C und 14 bis 18 mm Hg bis auf etwa 5 ml eingeengt. Eine höhere Temperatur sollte vermieden werden, da in diesem Falle leicht flüchtige Aethylester zu einem gewissen Teil ebenfalls abdampfen.

Die verbleibende Restlösung wird mit Wasser auf das doppelte Volumen gebracht und mit 20 ml Chloroform dreimal ausgeschüttelt, wobei Lipoide und die Aminosäure-Aethylester, ausgenommen die Monoaethylester der Dicarbonsäuren, in der lipophilen Phase in Lösung gehen. Auf deren weitere Aufarbeitung wird später einzugehen sein.
Die wäßrige Lösung wird bei 60° C und 14 bis 18 mm Hg zur Trockne eingedampft und diese mit 95%igem Aether eluiert. Diese Lösung ist zu filtrieren und das Filter nachzuwaschen. Nach Abdampfen des Aethanols kann die Trocken quantitativ aufgenommen werden.
Das Verfahren führt zu einem gewissen Verlust an Asparaginsäure, da diese Substanz in höher konzentriertem Aethanol nur sehr wenig löslich ist. Nach COHN und EDSALL (1943) lösen sich bei 25° C in 20%igem Aethanol 0,0149 Mol Asparaginsäure pro Liter, in 80%igem Aethanol 0,00071 und in absolutem Aethanol 0,0000116.

Wird auf eine quantitative Bestimmung der Asparaginsäure Wert gelegt, kann anstelle des Aethanols salzsaures Aceton (Aceton : HCl 32% = 10 : 1) zur Elution der Trockne verwendet werden. Die nach sorgfältigem Abdampfen des Acetons und der Säure zurückbleibende wäßrige Lösung kann nach eigenen Beobachtungen organische Bestandteile enthalten, besonders Kondensationsprodukte des salzsauren Acetons (Phoron), die bei weiterem Eindampfen eine rot-gelbe, ölige Flüssigkeit ergeben. Diese ist wasserlöslich und stört die weitere chromatographische Auftrennung. Ein Teil der Aminosäuren wird am Start zurückgehalten, andere bilden lange Schwänze, die eine sichere Auftrennung verhindern. Versuche, diese Substanzen aus der wäßrigen Phase auszuschütteln, zeigten bei Verwendung von Chloroform und Essigsäureaethylester gute Ergebnisse, die besten Chromatogramme wurden nach dreimaligem Ausschütteln mit Essigester bzw. Chloroform erzielt.

Die verbleibende wäßrige Phase wird ebenfalls bei 60° C und 14 bis 18 mm Hg zur Trockne eingedampft und anschließend in 1 ml Wasser aufgenommen und aufgetragen. Die Verwendung salzsaurer Lösungen sollte bei diesem letzten Schritt unterbleiben, da ein nicht vollständiges Abdampfen der Salzsäure vom Startfleck - wie bereits erörtert - zu Veresterungen mit alkoholischen Fließmitteln führt.

2. DARSTELLUNG DER AMINOSÄURE-AETHYLESTER AUS SERUM

Die Aethylester der Amino-monocarbonsäuren sowie die Diaethylester der Amino-dicarbonsäuren sind - wie bereits erwähnt - in dem zur Extraktion der Lipoide verwendeten Chloroform enthalten. Nun erwies es sich bei Trennung der Aminosäure-aethylester mit Benzol/Aethanol (75 : 25) als besonders wertvoll, daß Stoffe mit Lipoidcharakter in diesem Fließmittel mit der Front wandern und daher die Auftrennung der Ester nicht stören. Das zur Extraktion der Lipoide verwendete Chloroform, das darüber hinaus die Ester enthält, kann also, ohne von den Lipoiden befreit zu werden, zur Darstellung der Ester herangezogen werden. Die Lösung wird bei Zimmertemperatur bis fast zur Trockne eingedampft, in 1 ml 70%igem Aethanol aufgenommen und aufgetragen.

Werden Ester mit einem organischen Lösungsmittel, z. B. Chloroform, aus wäßriger Lösung ausgeschüttelt, so gehen sie entsprechend dem NERNST'schen Verteilungssatz je nach Löslichkeit anteilig in beiden Phasen in Lösung. Da nur die organische Phase weiterverwendet wird, sind Verluste nicht zu vermeiden. Dies ist zu bedenken, wenn Ester aus enteiweißtem Serum quantitativ extrahiert werden sollen. Deshalb wurde die quantitative Ausmittelung der Ester auf folgende Weise versucht: Das Serum wird durch Acetonfällung in der Kälte enteiweißt, sodann bei 45° C und 14 bis 18 mm Hg zur Trockne eingedampft. Die Trockne wird zweimal mit je 15 ml Aether aufgenommen. Die aetherische Lösung enthält die aether-

löslichen Ester quantitativ und einen Teil der Aminosäuren. Ester und Säuren können nach Eindampfen zur Trockne und Aufnahme mit 1 ml 70%igem Aethanol aufgetragen und chromatographisch getrennt werden.

Das nach Aufnehmen der Serumtrockne mit Aether zurückbleibende Sediment enthält alle aetherunlöslichen Aminosäuren; ihre quantitative Bestimmung ist möglich, wenn der mit Aether bereits aufgenommene Anteil zurückgewonnen wird. Dieser Anteil wird in dem Startfleck gefunden, der nach Chromatographie des Gemisches aus Aminosäure-aethylestern und Aminosäuren in Benzol/Aethanol (75 : 25) als Fließmittel zurückbleibt. Dieser Startfleck wird aus der Schicht gelöst und dem Sediment wieder zugefügt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt, wie bereits beschrieben, durch Aufnahme in 95%igem Aethanol oder Aceton.

3. TRENNUNG DER AMINOSÄUREN UND IHRER AETHYLESTER DURCH DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die Auftrennung der Substanzen erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-G-Schichten nach BRENNER und NIEDERWIESER (1960): 30 g Kieselgel-G werden 30 Sekunden mit 60 g Wasser geschüttelt, sofort in das Streichgerät gegossen und auf die mit Äther entfettete Platte gebracht. Nach dem Mattwerden der Schicht kann sie 15 Minuten lang bei 110° C getrocknet und dann 30 Minuten lang an der Luft liegen gelassen werden. Nach eigenen Erfahrungen werden Schichten, die 24 Stunden an der Luft trockneten, wesentlich widerstandsfähiger und erlauben eine zuverlässigere Reproduktion der Rf-Werte. Nach Abstreifen der Plattenränder jeweils 2 mm breit sind die Schichten gebrauchsfertig.

a) Auftragen der Lösungen

Zum Auftragen der Lösungen auf die Schicht wurde nach Beschreiten mehrerer Wege schließlich eine Pipette (0,1 ml) verwendet, in die ein aus einem Leinenfaden gedrehter Docht eingeführt wurde (Abbildung 5).

Die Abgabe der Lösung an die Schicht erfolgt durch Kapillarwirkung. Sie geht so langsam vor sich, daß der Durchmesser des Startflecks beliebig klein gehalten werden kann; auch wird auf diese Weise eine gröbere Verletzung der Schicht vermieden. Zur Messung bestimmter Flüssigkeitsmengen wird die Pipette bis über eine obere Meßmarke, z.B. 0,05 ml, gefüllt und auf Fließpapier bis zu dieser Marke entleert. Daraufhin wird bis zum Erreichen der unteren Meßmarke, z.B. 0,01 ml, aufgetragen. Die abgegebene Lösungsmenge beträgt also 0,04 ml.

Abbildung 5

Schematische Darstellung der verwendeten Dochtpipette zum Auftragen kleiner Volumina auf Dünnschichtplatten

Um Fehler zu vermeiden, sollte die Pipette stets waagerecht gehalten werden. Der Fehler, der durch Verdunsten des Lösungsmittels am Docht während des Auftragens entsteht, kann vernachlässigt werden. Es dampft lediglich ein geringer Anteil des flüchtigen Lösungsmittels ab, so daß vorübergehend eine Konzentrierung der Lösung im Docht eintritt. Diese wird aber durch das aus der Pipette nachfolgende Lösungsmittel ständig wieder aufgehoben, so daß die gesamte, in der abgemessenen Menge Lösungsmittel vorhandene Substanzmenge auch auf die Schicht gelangt. Für die beschriebene Pipettiermethode kann mit einer Messgenauigkeit von etwa ± 1% gerechnet werden. Die Methode erlaubt ein sicheres Auftragen von Volumina zwischen 0,01 und 0,09 ml.

b) Auftrennung der Aminosäuren

Bei der Trennung der Aminosäuren wurde besonderer Wert auf sichere Isolierung von Glutamin- und Asparaginsäure gelegt. Die zu diesem Zweck getroffene Auswahl der Fließmittelsysteme stützte sich auf die in der Literatur mitgeteilten Rf-Werte; so auf BRENNER, NIEDERWIESER und PATAKI (1962) für die Fließmittel 1 bis 3 und auf CODERN, GADEA, GAL und MONTAGUT (1963) für die Fließmittel 4 bis 12 (Tabelle 7, Zahlenschlüssel siehe Tabelle 8).
Infolge der bekannten Schwierigkeiten, die von anderen Autoren bestimmten Rf-Werte exakt zu reproduzieren, könenn diese Werte nur als Richtwerte angesehen werden. Auch weist PATAKI (1966) darauf hin, daß die Ergebnisse von CODERN und Mitarbeitern (1963) zum Teil denen anderer Autoren widersprechen, im wesentlichen allerdings nur bei Leucin, Serin und Threonin. Diese Aminosäuren interessieren hier jedoch nur in zweiter Linie, so daß die angegebenen Rf-Werte verwendbar schienen.

Obwohl eine sehr verläßliche eindimensionale Trennung der Glutamin- und Asparaginsäure bei geringem Zeitaufwand mit Aethanol/Ammoniak (4:1) nach MUTSCHLER und ROCHELMEYER (1959) gelingt, fehlen in dieser Aufstellung ammoniakalische Fließmittel. Infolge der Anwesenheit von Ammoniak sind diese Systeme lediglich zu qualitativem Nachweis geeignet. Die zur Anfärbung der Aminosäuren und deren Ester herangezogene Ninhydrinreaktion läuft auch mit Ammoniak ab und führt bei dessen Anwesenheit zu einer Rotfärbung der Schicht. Die untere Nachweisbarkeitsgrenze wird auf diese Weise stark erhöht und die quantitative Bestimmung unsicher.

Ammoniak geht eine sehr feste, adsorptive Bindung mit Kieselgel ein und ist sehr schwer aus der Schicht zu entfernen. Eigene Versuche, den nach Anwendung ammoniakalischer Fließmittel in der Schicht verbliebenen Ammoniak zu entfernen, verliefen unbefriedigend. Sowohl nach halbstündigem Überströmen der Schichten mit erwärmter Luft, als auch nach mehrstündigem Erhitzen der Platten auf 110° C, ferner nach 12stündigem

Fließ-mittel / Amino-säure	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
α Ala	37	22	29	20	34	31	18	24	34	69	31	13
β Ala	26	22	30	22	18	27	20	28	17	53	28	12
Arg	02	06	19	09	05	07	07	21	06	12	06	03
Asp	33	17	06	12	20	10	09	06	19	50	32	07
Asp(NH_2)		14		11	20	09	16	07	25	45	30	12
Cys				08		05	12					07
Glu	35	24	10	18	15	28	13	09	24	54	32	07
Gly	32	18	24	16	22	22	10	21	23	61	26	10
His	20	05	32	07	49	03	12	31	29	59	31	09
Leu	55	44	48	41	53	52	38	45	51	79	59	37
Ileu	53	43	49	43	54	48	33	47	53	81	54	32
Nleu	57	45	52	46	53	58	31	52	57	82	60	41
Lys	02	03	09	06	14	04	06	07	05	07	05	02
Met	51	35	49									
Phe	58	43	55									
Pro	26	14	50	14	30	15	22	43	18	43	31	11
Ser	35	18	20	18	26	12	26	66	30	61	26	14
Thr	37	20	26	23	56	17	10	20	34	68	39	13
Try	62	47	63	49	54	60	38	46	51	79		48
Tyr	57	41	47	42	38	50	34	46	58	89	58	40
Val	45	32	40	31	52	40	41	36	46	76	52	21
Nval	50	36	42	39	53	44	37	41	48	80	50	25

Tabelle 7

Rf-Werte für einfachen Lauf nach Angaben im Schrifttum, gegliedert nach Fließmitteln
Der Zahlenschlüssel in der Kopfzeile ergibt sich aus Tabelle 8

Tabelle 8

Zahlenschlüssel der Fließmittel in Tabelle 7, 9 und 10

Nr.	Fließmittel
1	Propanol/Wasser 7:3
2	Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1
3	Phenol/Wasser 75:25 g/g
4	Butanol/Eisessig/Wasser 65:15:20
5	Butanol/Benzylalkohol ges. mit Wasser 1:1
6	Butylalkohol/Ameisensäure/Wasser 75:15:10
7	Kollidin/Wasser 25:44
8	Phenol/Wasser 4:1 g/g
9	Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser/Diaethylamin 10:10:7:0,3
10	Lutidin/Wasser 65:35
11	Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser 35:35:30
12	Butanol/2-Butanon/Wasser 2:2:1

Stehenlassen der Platten im Vakuum (14 mm Hg) oder gleichlangem Verbleiben in einer durch konzentrierte Schwefelsäure ammoniakfrei gemachten Atmosphäre trat Rotfärbung des Untergrundes auf. Sie unterblieb, wenn frisch hergestellte Platten in einem ammoniakfreien Fließmittel chromatographiert und nach kurzer Trocknung im Luftstrom in eine Kammer gebracht wurden, auf deren Boden sich eine mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllte Schale befand (HEILMANN, BARROLIER und WATZKE, 1957). Auf diese Weise werden die Schichten auch dem stets in der Laboratoriumsluft vorhandenen Ammoniak entzogen.

Als die zur sicheren Trennung notwendige Mindestdifferenz zweier Aminosäuren wurde ein Rf-Wert von 0,10 angesehen. Eine Verbesserung der Auftrennung tritt bei Substanzen mit Rf-Werten bis zu etwa 0,50 durch mehrmalige Entwicklung in gleicher Richtung ein. Die hierdurch resultierenden Rf-Werte nach dem n-ten Lauf berechnen sich nach JEANES, WISE und DIMLER (1951) aus:

$$Rf_n = 1 - (1 - Rf)^n.$$

Sie können auch nach den von LENK (1961) und HALPAAP (1963) mitgeteilten Diagrammen bestimmt werden. In Tabelle 7 werden die Rf-Werte für einfachen, in Tabelle 9 für zweifachen Lauf mitgeteilt. Die in der letzten Tabelle dargestellten Rf-Werte für die einzelnen Fließmittelsysteme (siehe Tabelle 8) wurden durch eigene Berechnungen mit Hilfe der zitierten Formel aus den Rf-Werten in Tabelle 7 ermittelt. Tabelle 10 enthält die Wanderungsstrecken der Aminosäuren in Millimeter bei 150 mm Laufstrecke der Fließmittelfront, die aus den Zahlenwerten in Tabelle 7 und 9 sowohl für den einfachen (a), als auch für den doppelten Lauf (b) berechnet worden sind.

Bei der Suche nach Fließmittelkombinationen, die Asparagin- und Glutaminsäure hinreichend isolieren (bei zweimaligem Lauf in einer Richtung und einmaliger Auftrennung in zweiter Dimension), wurde folgender Weg beschritten: Die in Tabelle 9 zusammengestellten Rf-Werte der Aminosäuren für zweimaligen Lauf in verschiedenen Fließmitteln wurden mit einem (+)

Fließmittel / Aminosäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
α Ala	60 -	39+-	50	36 -	56	52 -	33 -	42	56	69	52+-	24
β Ala	45	39+-	51	39 -	33+-	47 -	36	48	31+	53+-	48 -	23+-
Arg	04	12	34	17+-	10	14+	14+	38	12	12	12	06+-
Asp	55 -	31	12 -	23	36 -	19	17 -	12 -	34 -	50 -	54 -	14 -
Asp(NH_2)		26		23	36 -	17	29	14	44	45	51	23
Cys	54+-			15		08	23+-					14+-
Glu	58+	42	19+	33	28+	48	24+	17+	42+	54+	52+	14+
Gly	54+-	33+-	42	29+-	39+	39	19+-	38	41+-	61 -	45+-	19+-
His	36	10	54	14+-	74	06	23+-	52	50 -	59+-	52+-	17+-
Leu	80	69	74	65	78	77	60	70	76	79	83	60
Ileu	78	68	74	68	78	63	55	72	78	81	79	54
Nleu	82	70	77	71	78	82	52	77	82	82	84	65
Lys	04	06	17+-	12	26 -	08	12+	14+-	10	07	10	04
Met	76	58	74									
Phe	82	68	80									
Pro	45	26+	75	26+-	51	28+	39	68	33+-	43+	52+-	21+-
Ser	58 -	33+-	36	33 -	45+	23+	45	88	51 -	61	45+-	26
Thr	60 -	36+-	45	41 -	81	31	19+-	36	56	68	63+	24
Try	86	72	86	74	78	84	62	71	76	79		73
Tyr	82	65	72	66	62	75	56	70	82	89	82	64
Val	70	54	64	52	77	64	65	59	71	76	77	38
Nval	75	59	66	63	78	69	60	65	73	80	75	44

Tabelle 9

Rf-Werte für doppelten Lauf (Zahlenschlüssel in der Kopfzeile siehe Tabelle 8)

Fließ-mittel	2		3		4		6		8		9	
Amino-säure	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
α Ala	33	58	43	75	30	54	46	78	36	63	51	84
β Ala	33	58	45	75	33	58	40	70	42	72	25	46
Arg	09	18	28	51	13	25	10	20	31	57	09	18
Asp	25	46	09	18	18	34	15	27	09	18	28	51
Asp(NH_2)	21	39			16	30	13	25	10	20	37	66
Cys					12	22	07	14				
Glu	36	63	15	27	27	49	42	72	13	25	36	63
Gly	27	49	36	63	24	43	33	58	31	57	34	61
His	07	14	48	81	10	20	04	08	46	78	43	75
Leu	66	103	72	111	61	97	78	115	67	105	76	114
Ileu	64	102	73	111	64	102	72	109	70	108	79	117
Nleu	67	105	78	115	69	106	87	123	78	115	85	123
Lys	04	08	13	25	09	18	06	12	10	20	07	14
Met	52	87	73	111								
Phe	64	102	82	120								
Pro	21	39	75	112	21	39	22	42	64	102	27	49
Ser	27	49	30	54	27	49	18	34	99	132	45	76
Thr	30	54	39	67	34	61	25	46	30	54	51	84
Try	70	108	94	129	73	111	90	126	69	106	76	114
Tyr	61	97	70	108	63	99	75	112	69	106	87	123
Val	48	81	60	96	46	78	60	96	54	88	69	106
Nval	54	88	63	99	58	94	66	103	61	97	72	109

Tabelle 10

Wanderungsstrecken der Aminosäuren in Millimeter für einfachen (a) und doppelten (b) Lauf bei einer Fließmittellaufstrecke von 150 mm (Zahlenschlüssel in der Kopfzeile siehe Tabelle 8)

markiert, wenn sie sich vom Rf-Wert für Asparaginsäure um nicht mehr als 0,09 unterschieden. Rf-Werte, die sich von der Glutaminsäure um nicht mehr als 0,09 unterschieden, wurden mit (-) bezeichnet. Die auf diese Weise markierten Säuren sind unter den gewählten Bedingungen in einer Dimension also nicht sicher von Asparagin- und/oder von Glutaminsäure zu trennen. Bei zweidimensionaler Chromatographie gelingt die Trennung dieser Säuren von Asparagin- und/oder Glutaminsäure dann, wenn die Rf-Werte der Säuren für das zweite Fließmittel um mehr als 0,09 differieren. Sie bleiben in diesem Fall also unmarkiert. Es sind mithin solche Fließmittelkombinationen geeignet, bei denen die Rf-Werte jeder Säure für beide Fließmittel nur einmal markiert sind. Solche Kombinationen sind nach Tabelle 9 die Fließmittel 2 (Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1) und 3 (Phenol/Wasser 75 : 25), 3 und 4 (Butanol/Eisessig/Wasser 65 : 15 : 20), 3 und 6 (Butylalkohol/Ameisensäure/Wasser 75 : 15 : 10), 4 und 8 (Phenol/Wasser 4 : 1), 6 und 8 sowie 6 und 9 (Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser/Diaethylamin 10 : 10 : 7 : 0,3). Das zuletzt genannte Fließmittel wurde erprobt, aber zur Trennung nicht herangezogen, da das System aus vier Komponenten besteht, schwer konstant zu halten ist und zur Entmischung neigt. Die sich in engen Grenzen durch das Mischungsverhältnis der Komponenten unterscheidenden Fließmittel 3 (Phenol/Wasser 75 : 25) und 8 (Phenol/Wasser 4 : 1) liefern sehr ähnliche Ergebnisse, so daß die Untersuchung der Trenneffekte auf die Fließmittelpaare 2 (Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1) und 3 (Phenol/Wasser 75 : 25), 3 und 4 (Butanol/Eisessig/Wasser 65 : 15 : 20) sowie 3 und 6 (Butylalkohol/Ameisensäure/Wasser 75 : 15 : 10) beschränkt werden konnte.

Die nach den im Schrifttum mitgeteilten Rf-Werten zu erwartenden Fleckenkarten sind in den Abbildungen 6, 7 und 8 dargestellt. Hierin wurden für die nichtphenolischen Fließmittel die Rf-Werte für zweimaligen Lauf in einer Dimension, für die phenolischen für einmaligen Lauf eingetragen. Ein einmaliger Lauf in Phenol/Wasser (75 : 25) benötigt bei 150 mm Laufstrecke etwa 3 Stunden. Ein zweimaliger Lauf würde also, ohne die Zeit für die Zwischentrocknung zu berücksichtigen, 6 Stunden Laufzeit erfordern.

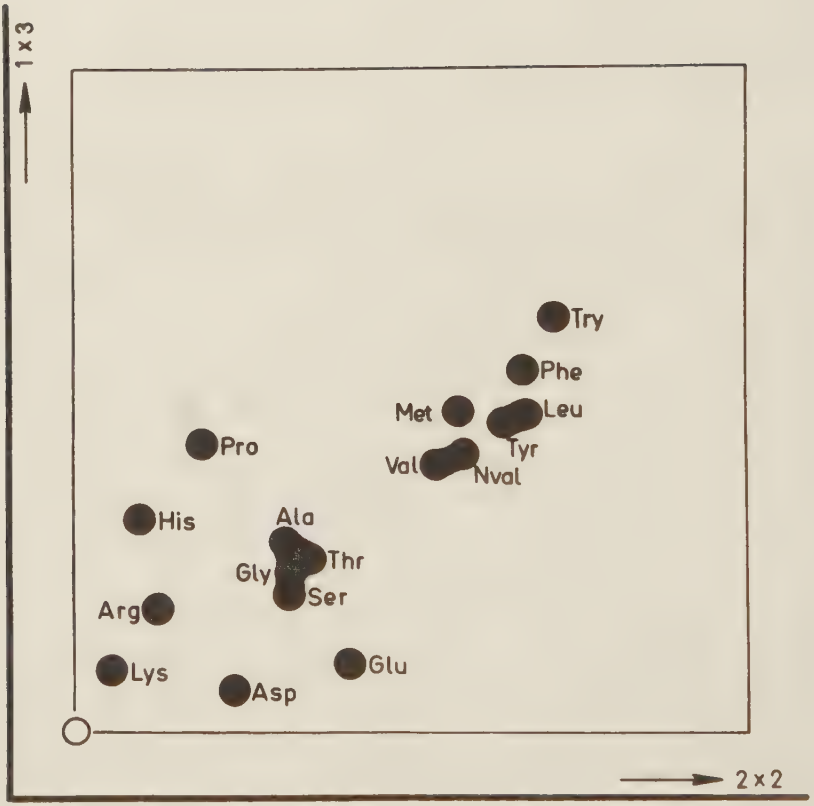


Abbildung 6

Fleckenkarte nach zweidimensionaler Chromatographie und einmaligem Lauf in Fließmittel 3 (Phenol/Wasser 75 : 25) und zweimaligem Lauf in Fließmittel 2 (Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1) in zweiter Dimension

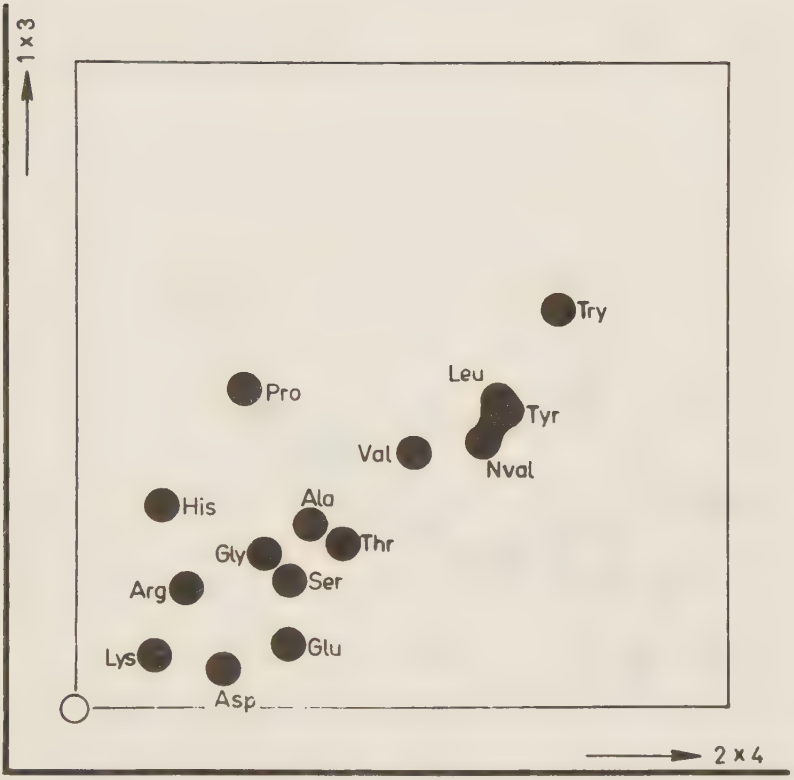


Abbildung 7

Fleckenkarte nach zweidimensionaler Chromatographie und einmaligem Lauf in Fließmittel 3 (Phenol/Wasser 75 : 25) und zweimaligem Lauf in Fließmittel 4 (Butanol/Eisessig/Wasser 65 : 15 : 20) in zweiter Dimension

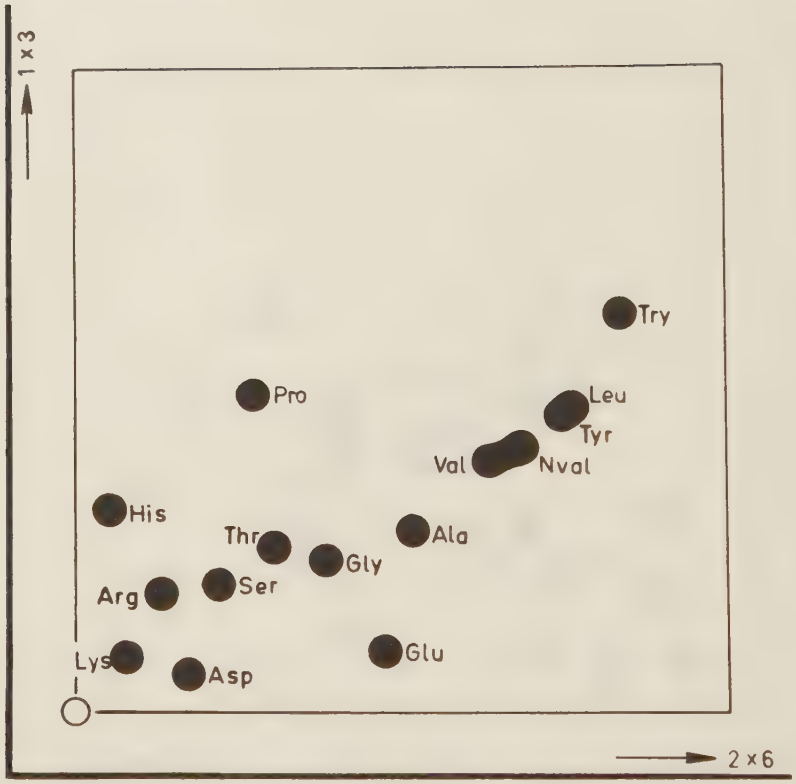


Abbildung 8

Fleckenkarte nach zweidimensionaler Chromatographie und einmaligem Lauf in Fließmittel 3 (Phenol/Wasser 75 : 25) und zweimaligem Lauf in Fließmittel 6 (Butylalkohol/Ameisensäure/Wasser 75 : 15 : 10) in zweiter Dimension

Ein einmaliger Lauf in diesem Fließmittel liefert jedoch bereits befriedigende Ergebnisse.

Die Fließmittelkombination 3 und 6 wurde als die geeignetste angesehen, da Glutamin- und Asparaginsäure gut getrennt werden und das Fließmittel 6 (Butanol/Ameisensäure/Wasser) leicht flüchtig ist, mithin ohne Schwierigkeiten aus der Schicht entfernt werden kann, Die Zwischentrocknung zwischen und nach den beiden Läufen in diesem Fließmittel erfolgte jeweils durch 15 Minuten langes Überströmen mit erwärmter Luft (Föhn).

Die Entfernung des Phenols (Fließmittel 3) erwies sich als schwierig. Ein Abdampfen im Trockenschrank läßt Phenoldämpfe in die Laboratoriumsluft treten und erfordert sehr viel Zeit, da sich die Schrankatmosphäre mit Phenoldämpfen sättigt. Eine Entfernung im Exsikkator bei 14 mm Hg über kristallinem NaOH erwies sich ebenfalls als zeitraubend und führte in mehreren Fällen zur Kristallisation des Phenols in der Schicht. Die geeignetste Methode ist auch hier die Trocknung unter dem Abzug mit dem Föhn, die etwa 30 Minuten erfordert. Eine auf diese Weise erzielte Auftrennung freier Aminosäuren aus frischem Rinderserum zeigt Abbildung 9.

c) Auftrennung der Aminosäure-aethyl-ester

MUSSINI und MARCUCCI (1965 und 1966) chromatographierten die n-Butylester der Aminosäuren auf Kieselgel-G-Schichten mit Benzol/Butanol (75 : 25), die Methylester mit Benzol/Methanol (75 : 25) und die n-Amylester mit Benzol/Pentanol (75 : 25). In diesen Fließmitteln blieben die freien Aminosäuren und die Derivate der basischen Aminosäuren am Start zurück, die übrigen Ester wanderten.

In Anlehnung an die Arbeiten dieser Autoren wurde bei den eigenen Untersuchungen über das chromatographische Verhalten der Aminosäure-aethyl-ester Benzol/Aethanol im Verhältnis 75 : 25 als Laufmittel verwendet. Als Sorbens diente Kieselgel-G. Es wurden 14 Aminosäure-

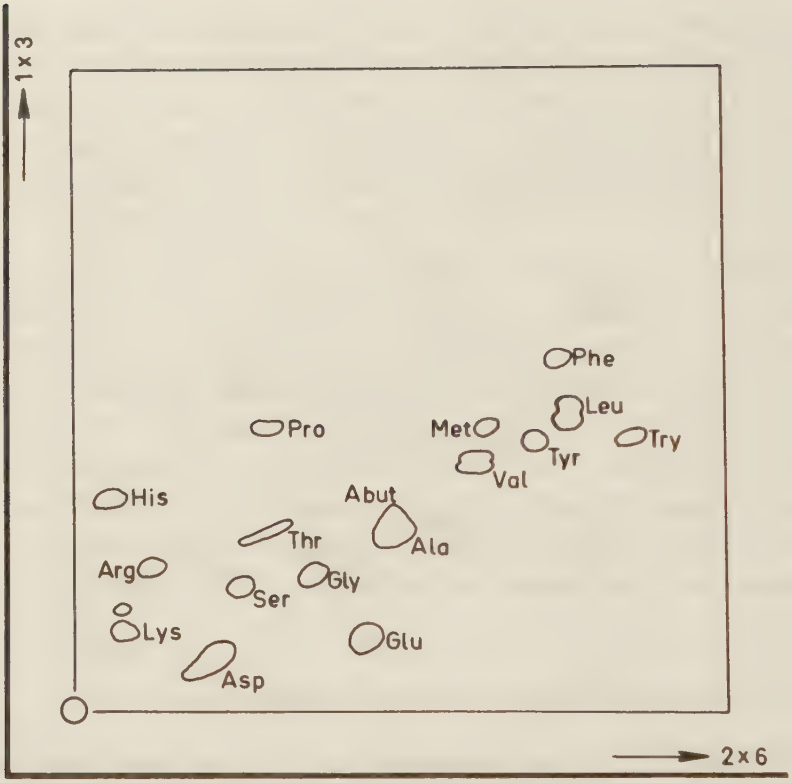


Abbildung 9

Auftrennung freier Aminosäuren aus Rinderserum durch zweidimensionale Chromatographie bei einmaligem Lauf in Fließmittel 3 (Phenol/Wasser 75 : 25) und zweimaligem Lauf in Fließmittel 6 (Butylalkohol/Ameisensäure/Wasser 75 : 15 : 10) in zweiter Dimension

aethylester untersucht und zwar die Monoaethylester von α-Alanin, β-Alanin, Glycin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin und Valin sowie der Mono- und Di-aethylester der Glutaminsäure. Von diesen sind 12 im Handel erhältlich; die Asparaginsäureester wurden synthetisiert. Das Produkt erwies sich als ein Gemisch aus Asparaginsäure-di-aethylester und Asparaginsäure-β-aethylester. Die Substanzen wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie mit Benzol/Aethanol (75 : 25) getrennt und durch Elution des Di-aethylesters in absolutem Aethanol und des β-Aethylesters in 50%igem Aethanol wiedergewonnen. Da die Konzentrationen dieser Lösungen nicht sicher bestimmt werden konnten, waren quantitative Bestimmungen der Asparaginsäureester nicht möglich. Die als Hydrochloride vorliegenden Reinsubstanzen der übrigen Aminosäureaethylester wurden in absolutem Aethanol mit festem Kaliumcarbonat unter Zugabe von Aether umgesetzt. Die aetherisch-alkoholische Lösung wurde eingedampft und die Trockne quantitativ in absolutem Aethanol aufgenommen.

Bei der Chromatographie der so gewonnenen Substanzen in Benzol/Aethanol (75 : 25) blieben zugesetzte freie Aminosäuren am Start zurück, außerdem auch die Monoaethylester der beiden Di-carbonsäuren, die sich unter den gewählten chromatographischen Bedingungen wie Aminosäuren verhalten. Eine Aufstellung der mit verschiedenen Fließmitteln gefundenen Rf-Werte der untersuchten Ester gibt Tabelle 11.

Eine vollständige Trennung zwischen Estern und Aminosäuren ist demnach in Benzol/Aethanol (75 : 25) möglich, mit Ausnahme der Mono-aethylester der Dicarbonsäuren und der Ester der basischen Aminosäuren. Eine Trennung der Diaethylester der Asparagin- und der Glutaminsäure ist mit den untersuchten Fließmitteln nur unvollständig möglich, da ihre Rf-Werte sich in allen untersuchten Fließmitteln nur wenig unterscheiden und für Mehrfachentwicklung zu groß sind. Weitere Untersuchungen hierzu erscheinen notwendig. Eine Auftrennung der in Benzol/Aethanol nicht wandernden Ester in den Fließmitteln 3 und 6 gemeinsam mit den Aminosäuren gelingt dagegen befriedigend. Das Bild einer Trennung freier Aminosäuren aus Rinderserum und dreier zugesetzter Ester zeigt Abbildung 10.

Fließmittel Aethylester	1	2	3	4	5
Asp-4-mono-	00	48	45	63	35
Asp-di-	67	Front	67	72	64
α-Ala-	44	79	55	63	54
β-Ala-	08	50	49	57	51
Glu-5-mono-	02	55	51	64	51
Glu-di-	70	Front	71	72	70
Gly-	33	71	48	57	49
Leu-	73	Front	76	83	81
Lys-	00	36	10	23	16
Met-	68	Front	68	80	72
Phe-	67	Front	76	86	79
Try-	65	42	69	82	83
Tyr-	64	Front	78	84	77
Val-	69	Front	46	80	67

Tabelle 11

Rf-Werte der Aethylester häufig vorkommender Aminosäuren in den Fließmitteln:

1 Benzol/Aethanol 75:25
2 Phenol/Wasser 75:25
3 Butanol/Eisessig/Wasser 4: 1: 1
4 Butanol/Ameisensäure/Wasser 75:15:10
5 Butanol/Eisessig/Wasser 65:15:20

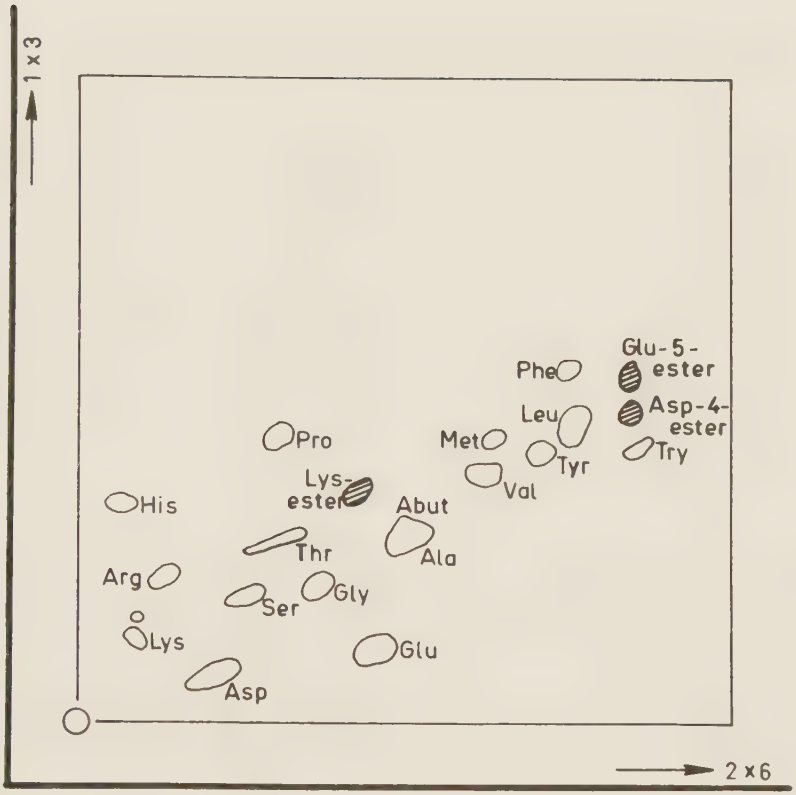


Abbildung 10

Auftrennung freier Aminosäuren aus Rinderserum, dem Asparaginsäure-4-, Glutaminsäure-5- und Lysin-aethylester zugesetzt wurden, durch zweidimensionale Chromatographie
(chromatographische Bedingungen wie Abbildung 9)

d) Anfärbung und quantitativer Nachweis der Aminosäuren und deren Aethylester

HEILMANN, BARROLIER und WATZKE (1957) lösen 100 mg Cadmium-Acetat + 10 ml Wasser + 5 ml Eisessig + 100 ml Aceton + 1 g Ninhydrin in der angegebenen Reihenfolge und besprühen mit dieser Lösung die waagerecht liegende Schicht bis zur vollständigen Durchfeuchtung. Das Lösungsmittel soll jedoch nicht fließen. Auf diese Weise entsteht ein großer Reagenzüberschuß, so daß keine Abhängigkeit zwischen der Reagenzmenge und der entstehenden Farbstoffmenge besteht. Die nach diesem Verfahren angefärbten Schichten wurden etwa 15 Minuten im kalten Luftstrom getrocknet und danach in einen verschlossenen Tank gebracht auf dessen Boden sich eine Schale mit konzentrierter Schwefelsäure befand. Die Farben sind nach 20 bis 24 Stunden entwickelt und ändern sich während weiterer 24 Stunden nicht (HEILMANN, BARROLIER und WATZKE, 1957).

Zur Ablösung der Farbflecken von der Glasplatte wurde mit einer Nadel eine Rinne um die Flecke gekratzt und diese mit einigen Tropfen 5%igem Collodium imprägniert. Sie heben sich beim Trocknen von der Glasplatte ab. Die Farbflecken werden sodann in je 3 ml eines Elutionsmittels gelöst, das aus Methanol + 3% Eisessig + 0,05% Cadmium-Acetat besteht. In diesem Elutionsmittel löst sich das Collodium blank auf (BARROLIER, 1961).
Bei jeder Messung wurde ein gleichgroßes ungefärbtes Stück aus der Nachbarschaft der zu bestimmenden Farbflecke entnommen, auf gleiche Weise gelöst und als Vergleichslösung zur Einstellung des Nullpunktes bei der Kolorimetrie verwendet. Nach Elution des Farbstoffes wurde das Schichtmaterial abzentrifugiert und die überstehende Lösung in einem EPPENDORF-PHOTOMETER bei 509 nm kolorimetriert. Die Extinktionskurven aller untersuchten Aminosäuren und Aminosäure-aethyl-ester wurden mit einem BECKMAN-Spektralphotometer aufgezeichnet.

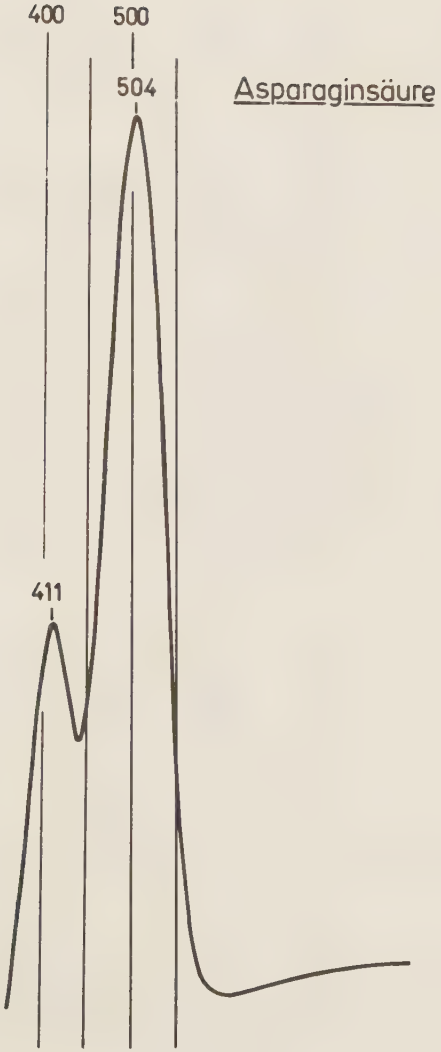


Abbildung 11 Extinktionskurve der Asparaginsäure

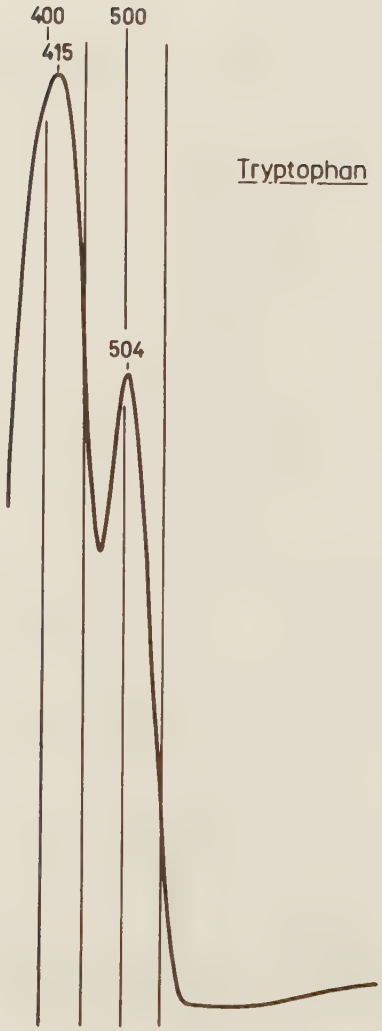


Abbildung 12 Extinktionskurve des Tryptophans

Sie entsprechen mit Ausnahme der des Tryptophans dem in Abbildung 11 dargestellten Typ, dessen Extinktionsmaximum mit 504 nm bestimmt wurde und der einen regelmäßig auftretenden weiteren Gipfel bei 411 nm aufwies. Dieser zweite Gipfel ist das Extinktionsmaximum des Tryptophans (Abbildung 12).

KNAUFF und SCHABERT (1960) bestätigten die Gültigkeit des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes für Aminosäuren; auch BARROLIER (1961) fand Geradlinigkeit seiner Eichkurven. In eigenen Untersuchungen wurde die Gültigkeit des Gesetzes für Aminosäuren und Aminosäure-aethyl-ester für den in Aussicht genommenen Konzentrationsbereich sowie die Genauigkeit des beschriebenen Verfahrens an drei Säuren und drei Estern überprüft. Es wurden von jeder Substanz je vier Proben in aufsteigenden Mengen auf der Schicht angefärbt, eluiert und anschließend kolorimetriert. Die weitere Berechnung der rechnerisch korrigierten Werte, des Regressionskoeffizienten sowie dessen Standardabweichung erfolgte nach folgenden Gleichungen:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{\Sigma xy - N\bar{x}\bar{y}}{\Sigma x^2 - N\bar{x}^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma(y - y')^2}{N - 2}}$$

(FREUDENBERG, 1962).

Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

- x = Menge der aufgetragenen Substanz in µg
- y = gemessene Extinktion
- y' = rechnerisch korrigierte Extinktion
- $\bar{x}$ = arithmetisches Mittel aus x
- $\bar{y}$ = arithmetisches Mittel aus y
- b = Regressionskoeffizient
- N = Fallzahl
- s = Standardabweichung.

Aminosäure Menge [µg]	Alanin		Asparaginsäure		Glutaminsäure	
	y	y'	y	y'	y	y'
2	0,107	0,106	0,022	0,021	0,038	0,036
4	0,215	0,216	0,042	0,045	0,080	0,079
6	0,324	0,325	0,071	0,070	0,113	0,121
8	0,436	0,435	0,094	0,094	0,168	0,163
Σy	1,0820		0,2290		0,399	
$\bar{y}$	0,2705		0,05725		0,09975	
Σxy	6,5060		1,390		2,418	
$\Sigma(y-y')^2$	0,000004		0,000011		0,000094	
s	0,000316		0,0005244		0,001533	
s [%]	0,58		4,3		7,25	

Tabelle 12

Daten zur Berechnung der Regressionsgeraden (Aminosäuren)

Ester Menge [µg]	Glutaminsäure-5-aethylester		Glutaminsäure-diaethylester		Alanin-aethylester	
	y	y'	y	y'	y	y'
4	0,058	0,061	0,065	0,063	0,045	0,046
6	0,094	0,091	0,095	0,097	0,070	0,069
8	0,123	0,122	0,131	0,131	0,093	0,092
10	0,150	0,152	0,166	0,165	0,114	0,115
Σy	0,425		0,457		0,322	
$\bar{y}$	0,10625		0,11425		0,0805	
Σxy	3,280		3,538		2,484	
$\Sigma(y-y')^2$	0,000023		0,000009		0,000004	
s	0,00075825		0,00047434		0,00031622	
s [%]	5,0		2,8		2,7	

Tabelle 13

Daten zur Berechnung der Regressionsgeraden (Aminosäure-aethylester)

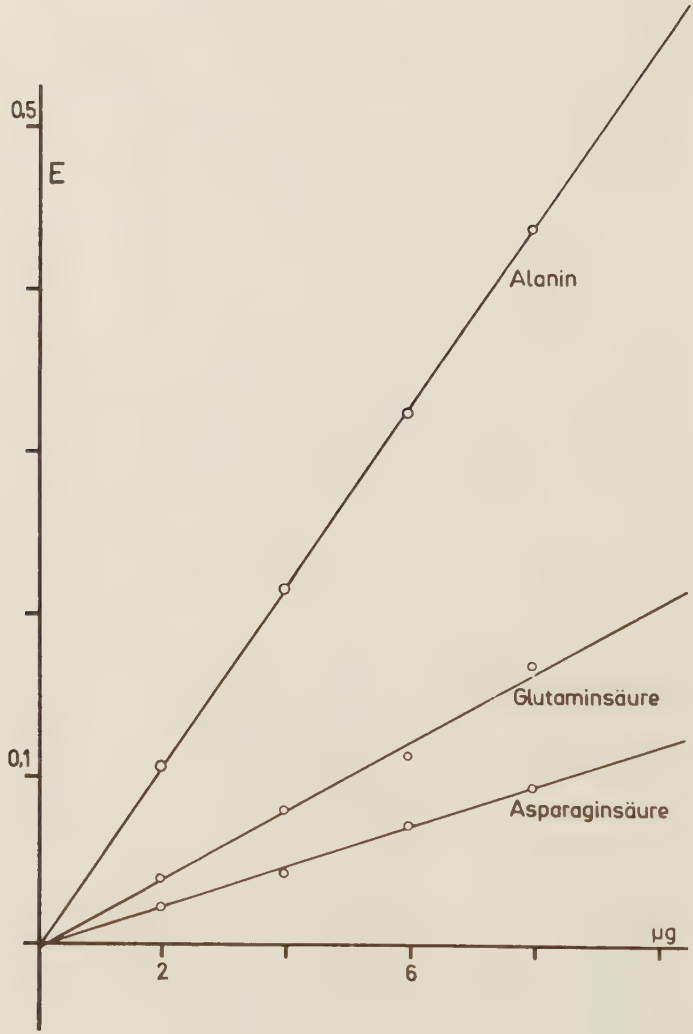


Abbildung 13 Eichkurven zu Tabelle 12

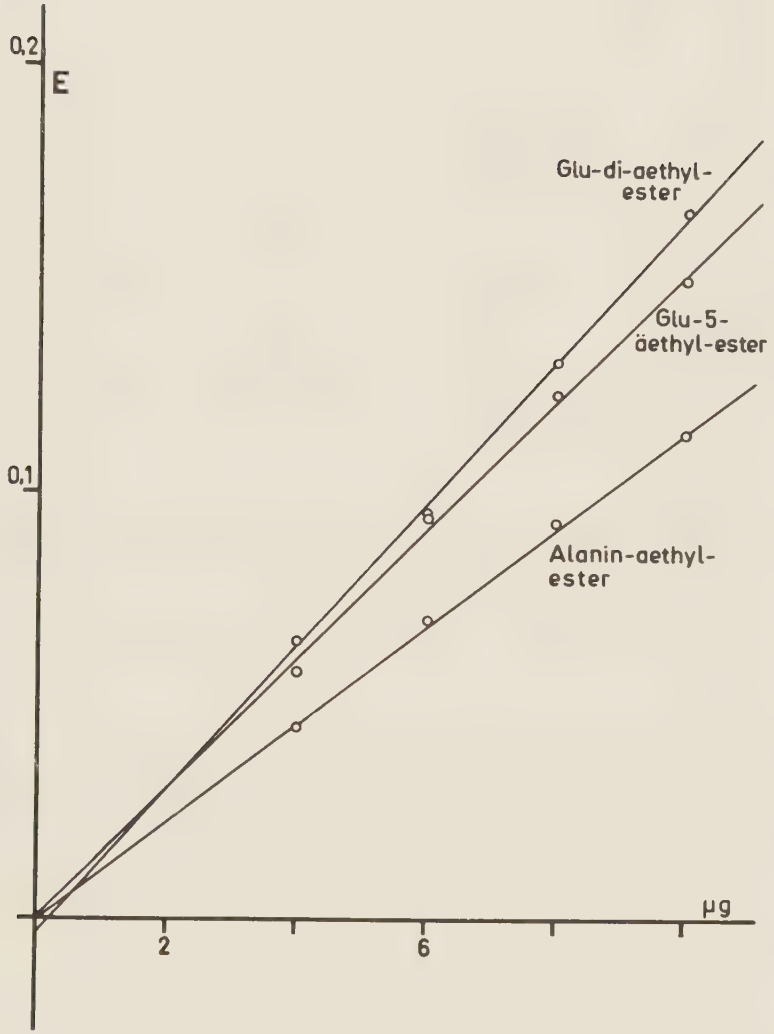


Abbildung 14 Eichkurven zu Tabelle 13

Der dem Schnittpunkt mit der y-Achse entsprechende Wert a müßte im vorliegenden Falle den Wert Null annehmen, d.h. die Eichkurve müßte den Nullpunkt des Koordinatensystems schneiden, denn der Substanzmenge 0 müßte die Extinktion 0 entsprechen. Tritt dieser Fall nicht ein, so liegt eine zusätzliche Absorption vor. Diese kann durch eine Trübung der Vergleichslösung oder durch eine Differenz der Küvetten herbeigeführt werden. In den vorliegenden Berechnungen schwankte der Wert a zwischen 0 und -0,006. Eine hierdurch veranlaßte Nachmessung der mit reinem Methanol gefüllten Küvetten ergab eine Absorption der Vergleichsküvette von 0,003 gegenüber der Probenküvette. Die Berechnungen sind in Tabelle 12 für die Säuren und in Tabelle 13 für die Ester aufgeführt. Die hieraus resultierenden Eichkurven zeigen Abbildung 13 und Abbildung 14. Die Untersuchungen zeigen, daß auch für die Aminosäure-aethylester das LAMBERT-BEER'sche Gesetz gilt.

Bei dieser Prüfung der quantitativen Bestimmung der Aminosäuren und ihrer Ester wurde ein durchschnittlicher Gesamtfehler für Auftragen der Substanz, einmaligen Lauf, Anfärbung, Elution und Kolorimetrie von 3,8% bestimmt. Der geringste Fehler betrug 0,6%, der höchste 7,25%.

Schließlich wurden die unteren Nachweisbarkeitsgrenzen der Aminosäure-aethylester für zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G in den Fließmitteln Benzol/Aethanol (75 : 25) und Butanol/Ameisensäure/Wasser (75 : 15 : 10) bestimmt. Die nach dem beschriebenen Verfahren erzielten Ergebnisse zeigt Tabelle 14.

Aminosäure-aethylester	µg	Aminosäure-aethylester	µg
Ala-	0,4	Lys-	0,05
Glu-5-	0,6	Phe-	0,5
Glu-di-	0,9	Pyr-	0,3
Gly-	0,02	Val-	0,8
Leu-	0,4		

Tabelle 14

Untere Nachweisbarkeitsgrenzen der Aminosäureaethylester bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G und Anfärbung mit Ninhydrin

V. DISKUSSION

Die im ersten Teil der Arbeit zusammenfassend aus dem Schrifttum dargestellten Untersuchungen über den Verlauf der Blutalkoholkurven bei gleichzeitiger oder kurz aufeinanderfolgender Aufnahme von Alkohol und Nahrungsmitteln lassen übereinstimmend eine Verminderung der Kurvenmaxima sowie ihrer Durchschnittswerte gegenüber Versuchen bei alimentärer Nüchternheit erkennen. Stellt man unter Zugrundelegung der WIDMARK'schen Beziehungen zum Resorptions- und Abbauverhalten des Alkohols der im Organismus wiedergefundenen Menge Alkohol die konsumierte gegenüber, so errechnet sich ein Defizit, das Größenordnungen von 36,8% (HERBICH und PROKOP, 1963) erreichnen kann. Die Konstante r muß hierbei für jede Versuchsperson in Nüchternversuchen bestimmt werden. Dieses hohe "Alkoholdefizit" übersteigt bei weitem die methodischen Fehlermöglichkeiten. Zur Deutung dieses Vorganges werden im Schrifttum vor allem drei Möglichkeiten diskutiert und zwar:

1. Eine Änderung der Resorption im Sinne einer Verzögerung oder adsorptiven Bindung im Darmkanal,
2. eine Änderung der Konstanten im Sinne einer durch Nahrungsbestandteile induzierten Veränderung der Verteilung des Alkohols im Organismus oder der Oxydation des Alkohols und
3. eine chemische Umwandlung oder Bindung des Alkohols, wodurch dieser Maskierung der alkoholischen Gruppe als solcher nicht nachgewiesen werden kann und auch seine physiologische Wirksamkeit verliert.

Zur ersten Möglichkeit stellt WIDMARK (1933 b) fest, daß unter diesen Bedingungen die Resorptionsgeschwindigkeit die Berechnung von β nicht beeinflußt und mithin eine verlangsamte Resorption durch die Nahrung für das vorliegende Problem ohne Interesse ist. Eine Bindung des Alkohols im Darm ist nach Untersuchungen SOUTHGATES (1926) nicht wahrscheinlich;

er digerierte Alkohol mit Brot, Milch, Pepsinsalzsäure, Pankreassaft und Darmschleimhaut und konnte anschließend keinen Alkoholverlust nachweisen. Inwieweit allerdings diese Beobachtungen für Verhältnisse in vivo zutreffen, ist bisher nicht geklärt. WIDMARK lehnt eine Abhängigkeit des Alkoholdefizits von einer Umwandlung des Alkohols vor der Resorption ab. Auch in den Faeces konnten keine Alkoholmengen gefunden werden, die das bei der guten Löslichkeit des Alkohols in wasserreichen Substanzen zu erwartende Maß übersteigen. Nimmt man schließlich den Verteilungsfaktor r und die Abbaugeschwindigkeit β im Sinne WIDMARKs als individuell festgelegte Konstanten an, so ist die Vorstellung einer Resorptionsverzögerung nicht haltbar.

Zur zweiten Möglichkeit gibt WIDMARK zu bedenken, daß sich eine Änderung des Faktors r in einer Wasserverschiebung aus dem Blut ins Gewebe zu erkennen geben müsse, führt aber hierzu aus, daß der Haematokrit vor und nach Fleischnahrung unverändert ist (1933 b) und sich eine Veränderung auch nicht nachweisen läßt, wenn die Nahrung nach der Resorption des Alkohols eingenommen wird. Er weist auch darauf hin, daß ein solcher Effekt der Digestion schwerlich während der ganzen Zeit, in der Alkohol im Blut nachgewiesen werden kann, unverändert bleiben würde. Die Alkoholwerte nähern sich indessen im Verlauf einer Untersuchung den für den leeren Magen berechneten nicht, so daß das Alkoholdefizit nicht durch eine veränderte Verteilung des Alkohols zwischen Blut und Gewebe erklärt werden kann. Zur Frage einer beschleunigten Oxydation bestimmte WIDMARK (1933 b) den Sauerstoffbedarf seiner Versuchsperson bei alimentärer Nüchternheit und nach Nahrungsaufnahme. Er stellte, von geringfügigen Schwankungen abgesehen, eine unveränderte Sauerstoffaufnahme während der gesamten Versuchdsauer fest; eine rein oxydative Umwandlung des Alkohols bei unveränderter Verbrennungsintensität des übrigen Brennmaterials würde jedoch eine Zunahme des Sauerstoffbedarfes von über 100% bedeuten. Auch unter der Aufnahme, daß der Alkohol bevorzugt oxydiert wird (BORNSTEIN und LOEWY, 1931), errechnet sich noch ein Mehrbedarf von 20%. Er schließt aufgrund dieser Untersuchungen eine beschleunigte Oxydation des Alkohols unter dem Einfluß der Nahrung aus. Auch läßt

sich der zum Alkoholdefizit führende Einfluß höchstens während der ersten 30 Minuten der Resorption nachweisen, so daß während dieser Zeit eine explosionsartige Oxydation des Alkohols erfolgen müßte.

Bezüglich der dritten Möglichkeit muß schließlich eine chemische Bindung oder Umwandlung des Alkohols vor oder während der Resorption als wahrscheinlich angesehen werden. Die von MAYER (1936) diskutierte chemische Bindung und Ausscheidung des Alkohols in den Faeces widerspricht nur scheinbar den Ergebnissen SOUTHGATEs, da in vitro gewonnene Erkenntnisse nur unter Vorbehalt auf Verhältnisse in vivo übertragbar sind, und der Alkohol nicht in dieser Form, sondern als Derivat nachgewiesen werden müßte. Nach ABDERHALDEN (1913, 1926) findet im Darmepithel nicht bloß eine Diffusion der Aminosäuren aus dem Magen-Darmtrakt statt, sondern die Resorption erfolgt durch aktiven Stofftransport. Eine Störung dieses Transportmechanismus, z.B. durch Veresterung der Carboxylgruppe der Säure, erscheint denkbar.

WIDMARK (1932) vermutet eine Esterbindung des Alkohols, für die aber nach stöchiometrischen Überlegungen die Nahrungsfette nicht ausreichen, so daß er die Aminosäuren als Reaktionspartner des Alkohols ansieht. Den Ort dieser Esterbildung sieht er in Darmepithel und Leber. Diese Ansicht wird in neuerer Zeit insbesondere von ELBEL und SCHLEYER (1956) gestützt.

Es muß angenommen werden, daß die mögliche Esterbildung im Organismus enzymatisch katalysiert wird. Als Katalysatoren kommen die seit längerem bekannten unspezifischen Esterasen in Betracht, deren Aktivität im Blut Gesunder von BERGMEYER (1962) mit 50 µg/h · ml angegeben wird. Diese Fermente katalysieren sowohl die Spaltung als auch die Bildung eines Esters. Die Lage des Gleichgewichts der Reaktion bleibt unverändert; es wird lediglich seine Einstellung, und zwar von beiden Seiten her, beschleunigt. Entspricht die vermutete Esterbildung diesem Reaktionstyp, so folgt sie also dem Massenwirkungsgesetz. Die Vorstellung einer chemischen Bindung des Alkohols könnte mithin, obschon nicht bewiesen, so doch gestützt werden, wenn bei ein und derselben Versuchsperson, also

unter weitgehend gleichbleibenden Resorptionsbedingungen, einer vermehrten Zufuhr eines der Reaktionspartner in nach Menge und Art gleichbleibender Darreichungsform eine anteilige Steigerung des Alkoholdefizits folgt.

Die nach den beschriebenen Verfahren erreichte untere Nachweisbarkeitsgrenze der Aminosäure-Aethylester liegt unter 1 µg. Es ist nun von Interesse, ob diese Empfindlichkeit dazu ausreicht, möglicherweise im Organismus gebildete Aminosäure-Aethylester nachzuweisen. Das Molekulargewicht des Aethanols beträgt 46, das durchschnittliche Molekulargewicht der regelmäßig vorkommenden Aminosäuren liegt bei 147. Da sich, wie bereits erwähnt, das bei der Esterbildung freiwerdende Wassermolekül aus der OH-Gruppe der Säure und dem Proton der alkoholischen Gruppe zusammensetzt, vermindern sich die Molekulargewichte auf 45 für den Alkohol und 130 für die Säure. Das Gewichtsverhältnis der Reaktionspartner kann also näherungsweise mit 1 : 3 angenommen werden, d.h. ein Teil Aethanol geht mit drei Teilen Aminosäure die Esterbindung ein.

Die in der Literatur mitgeteilten Alkoholdefizite bewegen sich zwischen 11,6% (WIDMARK, 1932) und 36,8% (HERBIG und PROKOP, 1963). Legt man einer Überschlagsrechnung eine Alkoholaufnahme von 30 g und ein Alkoholdefizit bei gleichzeitiger Nahrungsaufnahme von 10% zugrunde, so muß bei vollständiger Veresterung des fehlenden Alkoholanteiles eine Menge von 3 + 9, mithin 12 g Aminosäure-Aethylester im Organismus erscheinen. Da nicht anzunehmen ist, daß sich die Anwesenheit dieser Ester auf das Blutvolumen beschränkt, muß ein Verteilungskoeffizient, ähnlich dem Faktor r in die Überlegung eingeführt werden, der jedoch höchstens den Wert 1 erreichen kann. Bei einem Körpergewicht der Versuchsperson von 80 kg müßten die Ester mithin eine Mindestkonzentration von 12 000 : 800 mg%, also 15 mg% im Serum erreichen. Eine Probe von 10 ml Serum enthielte also 1,5 mg, eine solche von 1 ml Serum 0,15 mg Ester. Die Nahrungseiweiße setzen sich in der Regel aus etwa 20 Aminosäuren zusammen. Verteilt man die Estermenge gleichmäßig auf diese 20 Säuren, so müßte jeder einzelne Ester in diesen Serumproben mit 75 µg bzw. 7,5 µg enthalten sein.

Die dieser Berechnung zugrunde liegenden Versuchsbedingungen einer Alkoholaufnahme von 30 g und einer gleichzeitigen Eiweißzufuhr von 90 g sind unschwer herzustellen und werden bei fast allen im Schrifttum mitgeteilten Alkoholversuchen erreicht oder übertroffen. Da die untere Nachweisbarkeitsgrenze der Ester nach der beschriebenen Methode unter 1 µg liegt, müßte ihr Nachweis gelingen, wenn sie in nennenswerter Menge gebildet werden und in der untersuchten Körperflüssigkeit erscheinen. Dies gilt auch, wenn einschrankend berücksichtigt wird, daß die Menge der Ester zur Zeit der Probeentnahme nicht ihrer rechnerisch möglichen Höchstmenge entspräche, da entsprechend den biochemischen Gesetzmäßigkeiten der Synthese der Ester ihr Abbau parallel läuft.

Die Ergebnisse der eigenen experimentellen Untersuchungen dienten in erster Linie der Darstellung von Aminosäuren und ihren Aethylestern aus menschlichem und tierischem Serum. Hierzu erwies sich die Dünnschichtchromatographie als gut geeignet. Allerdings ist eine einwandfreie Trennung aller geprüften Aethylester im Modellversuch nicht gelungen. Während in den Fließmitteln Benzol/Aethanol und Butanol/Eisessig/Wasser in zweiter Dimension die Aethylester von α- und β-Alanin und Glycin sowie der Diaethylester der Asparaginsäure gut getrennt werden konnten, und auch die Monoaethylester der Asparagin- und der Glutaminsäure sowie der Lysinaethylester in den Fließmitteln Phenol/Wasser und Butylalkohol/Ameisensäure/Wasser in zweiter Dimension gut zu isolieren sind (siehe Abbildung 10), gelang die Trennung des Glutaminsäure-di-aethylesters sowie der Aethylester von Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin und Valin nur unbefriedigend. Da eine größere Anzahl von Laufmitteln geprüft worden ist, dürfte mit einer weiteren Auftrennung von Aminosäure-aethylestern mittels Dünnschichtchromatographie kaum zu rechnen sein. Möglicherweise wird sich eine Trennung mit Hilfe eines anderen chromatographischen Verfahrens, beispielsweise der Gaschromatographie, besser erzielen lassen. Aus diesem Grunde wurde von weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit abgesehen.

Eine wesentliche Frage wäre, in welchem Maße Aminosäure-aethylester durch Serumesterasen wieder gespalten werden. Im Rahmen der Zusatzversuche wurden bei Lagerung der Serumproben im Kühlschrank (+4° C) während einer Zeitspanne von 30 Minuten immerhin Verluste von 8 bis 10%, bezogen auf die zugesetzte Menge, beobachtet. Es besteht also die Möglichkeit, daß Ester dieser Art auch bei Kühlschranktemperatur in verhältnismäßig kurzer Zeit gespalten werden, auch wenn andererseits mit einem ins Gewicht fallenden Verlust durch die Eiweißfällung zu rechnen ist. Nach Angaben im Schrifttum (BERGMEYER, 1962) wäre bei einer Esteraseaktivität von 50 µg/h · ml (für Procain als Substrat) mit einem Umsatz von ca 50 mg · l Serum in einer Stunde zu rechnen. Diesbezügliche Untersuchungen sollten zur Klärung der hier aufgeworfenen Frage durchgeführt werden. Sollte eine Esterspaltung beträchtlichen Ausmaßes in kurzen Zeitspannen auftreten, so müßte zwangsläufig Alkohol wieder in Blut und Gewebe erscheinen und dementsprechend meßbar sein. Unter diesen Bedingungen entfiele die Esterbildung als mögliche Ursache des Alkoholdefizits.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der erste Teil der Arbeit enthält eine kritische Zusammenfassung der Literatur zum Thema des Alkoholdefizits bei gleichzeitiger oder kurz aufeinanderfolgender Alkohol- und Nahrungsaufnahme. Die Mehrzahl der Untersucher vertritt die Auffassung, daß die Ursache des Alkoholdefizits weniger in einer Resorptionsverzögerung oder einer Änderung der Konstanten r oder β zu suchen ist, sondern daß eine chemische Bindung und Maskierung eines Teils des konsumierten Alkohols, möglicherweise als Aminosäure-aethylester, stattfindet.

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit den Voraussetzungen einer Aminosäure-aethylesterbildung in vivo. Nach den Ergebnissen der theoretischen Untersuchungen ist eine enzymatisch katalysierte Esterbildung denkbar, zur Lage des Gleichgewichts und zum Reaktionsablauf werden weitere Untersuchungen vorgeschlagen.

Im dritten und vierten Teil der Arbeit wird das Schrifttum zur Darstellung und Auftrennung der Aminosäuren und ihrer Ester aus menschlichem und tierischem Serum kritisch gesichtet und eine Methode entwickelt, die bei geringem technischem Aufwand mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die qualitative Darstellung und quantitative Bestimmung der Aminosäuren sowie etwa der Hälfte der untersuchten Aminosäure-aethylester gestattet. Die übrigen Ester sind zwar von den Aminosäuren zu trennen, untereinander jedoch nur unvollkommen zu isolieren. Es wird empfohlen, für weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang andere chromatographische Verfahren heranzuziehen.

VII. LITERATUR

1) ABDERHALDEN, E.: Fütterungsversuche mit vollständig abgebauten Nahrungsstoffen. Ho Sey Zs 77, 22-58 (1911)

2) ABDERHALDEN, E.: Weitere Versuche über die synthetischen Fähigkeiten des Organismus des Hundes. Ho Sey Zs 83, 444-457 (1913)

3) ABDERHALDEN, E. und E.S. LONDON: Versuche über das Verhalten von Aminosäuren nach direkter Einführung in die Blutbahn und nach Einführung in den Darmkanal. Pf A 212, 735-740 (1926)

4) AWAPARA, J.: Application of paper chromatography to the estimation of free amino acids in tissues. Arch Bioch 19, 172-173 (1948)

5) BAILEY, J.L.: Techniques in Protein Chemistry Elsevier, Amsterdam 1962

6) BAUM, F.K.: Die Einflußnahme von konzentrierten NaCl-Lösungen auf den Verlauf von Blut- und Atemalkoholkurven Inaugural-Dissertation, Heidelberg 1953

7) BARROLIER, J.: Ein Ninhydrinreagenz für quantitative AS-Bestimmung auf Papierchromatogrammen Nat Wiss 42, 416 (1955)

8) BARROLIER, J.: Eine Methode zur Dokumentation von Dünnschichtchromatogrammen Nat Wiss 48, 404 (1961)

9) BERG, S.P.: Zur Frage einer Beeinflussung des Alkoholrausches durch Laevulose Med Klin 48, 626-628 (1953)

10) BERGER, H., ANTENER, I., BRECHBÜHLER, T. und G. STALDER: Zum Problem der Cystinose Ann Paed 202, 465-482 (1964)

11) BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/
Bergstr. 1962, S. 709

12) BEYER, H.: Lehrbuch der organischen Chemie
S. Hirzel, Leipzig 11./12. Aufl. 1966,
S. 204

13) BICKEL, A.: Biologische Wirkungen des Alkohols auf
den Stoffwechsel
Thieme, Leipzig 1936

14) BORNSTEIN, A.
und G. BUDELMANN: Die Ausscheidung von Alkohol und
Aether durch die Niere
Arch exp Path. Pharm 150, 47-69
(1930)

15) BORNSTEIN, A.
und A. LOEWY: Untersuchungen über den Alkoholumsatz
beim Menschen
Biochem. Z 191, 271-292 (1927)

16) BORNSTEIN, A.
und A. LOEWY: Über den Alkoholumsatz beim Menschen
im Höhenklima
Biochem Z 230, 51-67 (1931)

17) BOULANGER, P.
et G. BISERTE: Chromatographie de Partage des Amino-
acides Libres du plasma Sanguis
Bull Soc Chim Biol 31, 696-700 (1949)

18) BRAMSTEDT, F.: Persönliche Mitteilung
zitiert nach KLINGMÜLLER

19) BRENNER, M.
und A. NIEDERWIESER: Dünnschichtchromatographie von Amino-
säuren
Exper 16, 378-383 (1960)

20) BRENNER, M.,
NIEDERWIESER, A.
und G. PATAKI: Zur Reproduzierbarkeit der Rf in der DC
Exper 18, 101-104 (1962)

21) CARPENTER, Th. M.
and R.C. LEE: The effect of fructose on the metabolism
of ethyl alcohol in man
J Pharmacol 60, 286-295 (1937)

22) CARRIÉ, C.
und G. STÜTTGEN: Untersuchungen über den Tyrosingehalt
des Blutes nach Belastung
Klin Ws 28, 497-499 (1950)

23) CHAPHEAU, M.:

a) Action de la Phlorhizine et de l'acide
iodacétique sur la combustion de
l'alcool éthylique chez le Lapin
Comt rend Soc Biol 116, 887-889 (1934)

b) La combustion de l'alcool éthylique
chez le lapin au cours de quelques
intoxications
Comt rend Soc Biol 116, 889-890 (1934)

24) CHRISTENSEN, H.N. and E.L. LYNCH: The conjugated, non-protein amino acids of plasma J Biol Chem 163, 741-751 (1946)

25) CLARK, B.B. and R.W. MORRISSEY: Influence of insulin, glucose and alkalizing salts on the rate of disappearance of ethyl alcohol from the blood Am. J Phys 123, 37-38 (1938)

26) CODERN, L., GADEA, J., GAL, E. y M. MONTAGUT: Afinidad (Barcelona) 20, 159 (1963) zitiert nach PATAKI, G. 1966 Se. 82

27) COHN, E.J. and J.T. EDSALL: Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions Reinhold Publishing Corporation, New York p. 201 and p. 203

28) COHNHEIM, H.: Zur Frage der Eiweißresorption III. Mitteilung Ho Sey Zs 76, 293-297 (1911/12)

29) CONSDEN, R., GORDON, A.H. and A.J.P. MARTIN: The identification of lower peptides in complex mixtures Biochem J 41, 590-596 (1947)

30) CRAMER, F.: Papierchromatographie Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. 1962

31) DETERMANN, H.: Stofftrennung durch Chromatographie an porösen Gelen Ang Chem.76, 635-644 (1964)

32) DIRR, K.: Über Paraproteine im Serum Klin Ws 33, 818-822 (1955)

33) DIRR, K. und G. GÖTZ-SCHRIEVER: Myelom- und Nephroseeiweiß im Urin und ihre Erkennung durch Aminosäurebestimmung Z Klin Med 145, 186-193 (1949)

34) DIRR, K. und G. LEIS: Aminosäurenabbau und Serumeiweißkörper III. l(-)Tyrosin Ho Sey Zs 263, 216-220 (1940)

35) DIRR, K. und J. STREHLE: Aminosäurenabbau und Serumeiweißkörper I. l(+)Arginin im Eiweißfiltrat nach Belastung Ho Sey Zs 260, 56-64 (1939)

36) DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen, 1966 S. 527

37) DONTCHEFF, L.: a) Evolution de la vitesse d'oxydation de l'alcool éthylique au cours du jeûne chez le rat blanc Comt rend Soc Biol 126, 462-464 (1937)

38) DONTCHEFF, L.: b) Influence des divers types d'aliments sur la vitesse d'oxydation de l'alcool éthylique chez l'homéotherme inanitié Comt rend Soc Biol 126, 465-467 (1937)

39) DORFNER, K.: Ionenaustauscher: Eigenschaften und Anwendung Walter de Gruyter u. Co. Berlin, 1964

40) DOST, F.H.: Der Blutspiegel Thieme, Leipzig 1953

41) DRÈZE, A., and A. de BOECK: Arch int Phys Biochim 60, 201 (1952) zitiert nach STAHL, Se. 703-704

42) DRÈZE, A., MOORE, S. and E.J. BIGWOOD: Analyt Chim A 11, 554 (1954) zitiert nach STAHL, Se. 703-704

43) ELBEL, H.: Die wissenschaftlichen Grundlagen der Beurteilung von Blutalkoholbefunden Thieme, Leipzig 1937

44) ELBEL, H.: Neues zur Blutalkoholfrage Dt Zs Ger Med 30, 218-226 (1938)

45) ELBEL, H. und G. LIECK: Alkoholresorption nach Nahrungsaufnahme Dt Zs Ger Med 26, 270-276 (1936)

46) ELBEL, H. und F. SCHLEYER: Blutalkohol Die wissenschaftlichen Grundlagen der Beurteilung von Blutalkoholbefunden bei Straßenverkehrsdelikten Thieme, Stuttgart 1956

47) FAHMY, A.R., NIEDERWIESER, A., PATAKI, G. und M. BRENNER: Eine Schnellmethode zur Trennung und zum Nachweis von 22 Aminosäuren Helv Chim A 44, 2022-2026 (1961)

48) FISCHER, F.G. und H. DÖRFEL: Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweiß-Hydrolysaten Biochem Z 324, 544-566 (1953)

49) FISHER, R.B., PARSONS, D.S. and R. HOLMES: Quantitative paper chromatography Nature 164, 183 (1949)

50) FLODIN, P.: Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations J Chrom 5, 103-115 (1961)

51) FREUDENBERG, K.: Grundriß der medizinischen Statistik F.K. Schattauer, S. 168, Stuttgart 1962

52) FREUDENBERG, K. und H.J. MALLACH: Bemerkungen über die Konstanten c_o und r von Widmark Blutalkohol 3, 372-380 (1966)

53) GERNGROSS, O., VOSS, K. und T. HERFELD: Über eine hochempfindliche, streng tyrosin-spezifische Farbreaktion auf para-substituierte Phenole B D Ch G 1933 I, 435-442

54) GEROCK, W.: Quantitative Enteiweißung der freien und gebundenen Aminosäuren im Blutserum durch Elutionschromatographie an Ionenaustauschern Klin Ws 38, 1212-1215 (1960)

55) GIRI, K.V., RADHAKRISHNAN, A.N. and C.S. VAIDYANATHAN: Some factors influencing the quantitative determination of amino acids separated by circular paper chromatography Anal Chem 24, 1677-1678 (1952)

56) GOLDBERG, L. and T.P. STÖRTEBECKER: Effect of Estrone on alcohol intoxication Acta physiol Scand 5, Suppl. 16, 1923

57) GOLDFARB, W., BOWMAN, K.M. and S. PARKER: The effect of glucose and insulin on the disappearance of alcohol from the blood in man Am J Phys 126, P 504 (1939)

58) GRAF, O. und E. FLAKE: Zur Frage des Verlaufes der Alkoholblutkonzentration nach Alkoholgaben Arb Phys 6, 141-168 (1933)

59) GRÉHANT, M.W.: Nouvelles recherches sur l'alcoolisme aigu Comt rend Soc Biol 52, 894-897 (1900)

60) GREMELS, H.: Der Einfluß der Alkoholzufuhr auf die Zuckerverwertung Arch exp Path Pharm 205, 57-97 (1948)

61) HAGGARD, H.W. and L.A. GREENBERG: The effects of alcohol as influenced by blood sugar Scie 85, 608-609 (1937)

62) HAGGARD, H.W. and L.A. GREENBERG: Studies on the absorption, distribution and elimination of alcohol J Pharmacol 68, 482-493 (1940)

63) HAIS, M. und K. MACEK: Handbuch der Papierchromatographie VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963

64) HALPAAP, H.: Präparative Dünnschichtchromatographie Chem Ing Techn 35, 488-493 (1963)

65) HAMILTON, P.B. and D.D. van SLYKE: The gasometric determination of free amino acids in blood filtrates by the ninhydrin-carbondioxide method J Biol Chem 150, 231-250 (1943)

66) HANZLIK, P.J. and R.J. COLLINS: Quantitative studies on the gastro-intestinal absorption of drugs J Pharmacol 5, 185-213 (1913)

67) HARRIS, C.K., TIGANE, E. and C.S. HANES: Quantitative chromatographic methods Part 7 Isolation of amino acids from serum and other fluids Can J biochem physiol 39I, 439-451 (1961)

68) HEILMANN, J., BARROLIER, J. und E. WATZKE: Beitrag zur Aminosäurebestimmung auf Papierchromatogrammen Ho Sey Zs 309, 219-220 (1957)

69) HEPP, G.: Ärztliche und medizinische Erfahrungen auf der deutschen Himalajakundfahrt 1936 Münch med Ws 84, 765-767 (1937)

70) HERBICH, J. und L. PROKOP: Untersuchungen über den Einfluß von Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme auf den Blutalkoholspiegel Wien Klin Ws 75, 421-427 (1963)

71) HEYNS, K., KOCH, W. und W. KÖNIGSDORF: Über das papierchromatographische Verhalten einer salzsauren Lösung von Glutaminsäure Nat Wiss 39, 381 (1952)

72) HIER, S.W. and O. BERGEIM: The microbiological determination of certain free amino acids in human and dog plasma. J Biol chem 163, 129-135 (1946)

73) HIMWICH, W.A.: Absorption of 1-glutamic acid Scie 120, 351-352 (1954)

74) HUBEL, W. und M. BÜCHNER: Papierchromatographische Aminosäurebestimmung im Serum und im Harn D Ges Wes 20, 1819-1822 (1965)

75) INCZÉDY, J.: Analytische Anwendung von Ionenaustauschern
Verlag der Ung. Akademie der Wissensch. Budapest 1964

76) JANECKE, H. und I. MAASS-GOEBELS: Beobachtungen bei Vitaminbestimmungen
Z analyt Chem 178, 161-172 (1960)

77) JEANES, A., WISE, C.S. and R.J. DIMLER: Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates
Anal Chem 23, 415-420 (1951)

78) JIRGEL, V.: Papierelektrochromatographie der Aminosäuren des Blutserums
Exper 15, 235-237 (1959)

79) JOHNSON, C.A. and O. BERGEIM: The distribution of free amino acids between erythrocytes and plasma in man
J Biol chem 188, 833-838 (1951)

80) JUNGMICHEL, G.: Zur Physiologie der Alkoholverbrennung nach Bier und nach Mahlzeiten
Dt Zs Ger Med 22, 153-166 (1933)

81) KAWERAN, E. and Th. WIELAND: Conservation of amino-acid chromatograms
Nature 168, 77-78 (1951)

82) KLAVEHN, M. und H. ROCHELMEYER: Zur Analytik der Mutterkornalkaloide 4. Mitteilung
D A Z 101, 477-481 (1961)

83) KLEIN, H.: Kongreß d. Ges f. Ger. Med. München 1952

84) KLINGMÜLLER, V.: Biochemie, Physiologie und Klinik der Glutaminsäure
Editio Cantor, Aulendorf, 1955

85) KNAUFF, H.G., DIETERLE, P. und H. ZICKGRAF: Quantitative Bestimmung von 21 freien Aminosäuren bei gesunden Versuchspersonen
Ho Sey Zs 316, 186-198 (1959)

86) KNAUFF, H.G. und P. SCHABERT: Zur quantitativen Aminosäurenbestimmung in Körperflüssigkeiten und Organextrakten nach Elutionschromatographie an Ionenaustauschersäulen mit automatischer Registrierung der Ergebnisse
Klin Ws 38, 1206-1212 (1960)

87) KNAUFF, H.G., SELMAIR, H. und A. REITLINGER: Untersuchungen über die freien Aminosäuren im Harn und Blutplasma von Gesunden und Leberkranken
Klin Ws 38, 812-819 (1960)

88) KOCH, R. und H. HANSON: Zur Papierchromatographie von Glutamin- und Asparaginsäure Ho Sey Zs 292, 180-183 (1953)

89) KRAUT, H. und H. ZIMMERMANN-TELSCHOW: Die Veränderung der einzelnen freien Aminosäuren in Blut und Harn in Abhängigkeit von der Ernährung I. Ernährungsversuche mit Volleiprotein Nutr Dieta 4, 22-26 (1962)

90) KÜHN, G.: Untersuchungen über Alkohol II. Mitteilung Arch exp Path Pharm 103, 295-312 (1924)

91) KÜHNAU, J.: Biochemie des Nahrungseiweißes Ang Chem 61, 357-367 (1949)

92) KULPE, W. und H.J. MALLACH: Das Verhalten des Blutzuckerspiegels bei Alkoholzufuhr Z Klin Med 156, 252-261 (1960)

93) LENK, H.P.: Ein Diagramm zur Ermittlung von Rf-Werten bei Mehrfach-Papierchromatographie Z analyt Chem 184, 107-110 (1961)

94) LOOMIS, T.A.: A study of the rate of metabolism of ethyl alcohol J Stud Alc 11, 527-537 (1950)

95) MALLACH, H.J.: Fortschritte auf dem Gebiet der Blutalkoholforschung F Med 83, Nr. 19, 769-773 (1965)

96) MALLACH, H.J.: Über den Verlauf von Blutalkoholkurven nach Biergenuß Blutalkohol 3, 308-319 (1966)

97) MAYER, R.M.: Intermittierende Alkoholresorption, Speichelalkoholkurve und Alkoholwirkung Dt Zs Ger Med 26, 250-270 (1936)

98) MELLANBY, E.: Alcohol: Its absorption into and diappearance from the blood under different conditions Nat Hlth Insur Spec Rep Ser 31-37, p. 5-48 (1919)

99) MILES, W.R.: The comparative concentrations of alcohol in human blood and urine at intervals after ingestion J Pharm Exp Ther 20, 265-319 (1922)

100) MÜTING, D.: Über eine qualitative Farbreaktion zur Differenzierung von Aminosäuren auf Filtrierpapier
Nat Wiss 39, 303 (1952)

101) MÜTING, D.: Der Aminosäurehaushalt des Menschen
Editio Cantor, Aulendorf, 1958

102) MUSSINI, E. and F. MARCUCCI: Separation of amino-acid n-butyl esters by means of thin-layer chromatography
J Chrom 17, 576-577 (1965)

103) MUSSINI, E. and F. MARCUCCI: Privatmitteilung
zitiert nach PATAKI (1966)

104) MUTSCHLER, E. und H. ROCHELMEYER: Über die Trennung der Aminosäuren mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie
A Pharm 292, 449-452 (1959)

105) NEYMARK, M. und E.M.P. WIDMARK: a) Der Einfluß von Neutralfett, Fettsäure und Glycerin auf den Aethylalkoholumsatz
Skand Arch Physiol 73, 260-266 (1936)

106) NEYMARK, M. und E.M.P. WIDMARK: b) Zur Frage der Kinetik des Alkoholumsatzes im Organismus
Skand Arch Physiol 73, 283-290 (1936)

107) OEPEN, H. und I. OEPEN: Vergleich der Aminosäurespektren unterschiedlich enteiweißter Blutseren
Klin Ws 41, 921-926 (1963)

108) OSWALD, N. und H. FLÜCK: Getrennte Bestimmung von Alkaloideta mittels Dünnschichtchromatographie
Pharm A H 39, 293-304 (1964)

109) PATAKI, G.: Dünnschichchromatographischer Nachweis von Kreatinin im Urin
Schw M W 94, 1789-1790 (1964)

110) PATAKI, G.: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie
Walter de Gruyter u. Co, Berlin, 1966

111) PATAKI, G. und M. KELLER: Freie Aminosäuren im menschlichen Ejakulat
Helv Chim A 46, 1687-1691 (1963)

112) PATAKI, G. und M. KELLER: Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Aminosäuren im Blut
Z Klin Chem 1, 157-158 (1963)

113) PATTON, A.R. and P. CHISM: Quantitative paper chromatography of amino acids
Anal Chem 23, 1683-1685 (1951)

114) PONSOLD, A.: Die Plateaubildung (GRÉHANT) in der Blutalkoholkurve
Proc. 3rd intern. Confer. Alcohol and Road Traffic, London 1962
zitiert nach MALLACH (1966)

115) PORATH, J.: Gel filtration of proteins, peptides and amino acids
Biochim Biophys A 39, 193-207 (1960)

116) PROKOP, L.: Blutalkohol und Nahrungsaufnahme
Z ärztl Fortb 52, 407-412 (1963)

117) PURDY, S.J. and E.V. TRUTER: Quantitative analysis by thin-film chromatography
Anal 87, 802-809 (1962)

118) RANDERATH, K.: Dünnschichtchromatographie
Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/ Bergstr. 1962

119) SCHREIER, K. und H. BERGMANN: Beitrag zum Alaninstoffwechsel des Menschen
Klin Ws 29, 608-612 (1951)

120) SCHREIER, K. und H. PLÜCKTHUN: Untersuchungen über den Gehalt an freien Aminosäuren im Serum und Urin
Bioch Zs 320, 447-465 (1950)

121) SEIFERT, P. und H. GÜNTHER: Alkoholintoxikation und Atemalkohol
Arch exp Path Pharm 213, 37-43 (1951)

122) SHEFFNER, A.L., KIRSNER, J.B. and W.L. PALMER: Amino acid excretion in patients with gastrointestinal disease during ingestion of various protein supplements
Gastroent 16, 757-763 (1950)

123) SIMONIN, C.: Contribution à l'étude expérimentale de l'alcoolisme aigu
J Physiol Path gén 28, 596-611 (1930)

124) VAN SLYKE, D.D. and G.M. MEYER: Preliminary experiments on protein assimilation
J Biol Chem 12, 399-410 (1912)

125) VAN SLYKE, D.D. and G.M. MEYER: a) The fate of protein digestion products in the body
III. The absorption of amino-acids from the blood by the tissues
J Biol Chem 16, 197-212 (1913)

126) VAN SLYKE, D.D. and G.M. MEYER: b) IV. The locus of chemical transformation of absorbed amino-acids
J Biol Chem 16, 213-229 (1913)

127) VAN SLYKE, D.D. and G.M. MEYER: c) V. The effects of feeding and fasting on the amino-acid content of the tissues J Biol Chem 16, 213-246 (1913)

128) SOUTHGATE, H.W.: The effect of alcohol, under varying conditions of diet, on man and animals, with some observations on the fate of alcohol in the body Bioch J 19, 737-745 (1926)

129) SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. and S. MOORE: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids Fed Proc 17, 1107-1115 (1958)

130) STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967

131) STEIN, W.H. and S. MOORE: The free amino acids of human blood plasma J Biol Chem 211, 915-926 (1954)

132) STEPANOV, O., HANDSCHUH, A. und W. ANDERER: Peptidtrennung mit Sephadex Z f Nat Fo 166, 626-627 (1961)

133) STUHLFAUTH, K.: Über den Verbrennungsstoffwechsel des Alkohols Dt Zs Ger Med 42, 555-566 (1954)

134) STUHLFAUTH, K., ENGLHARDT-GÖLKEL, A., und J. SCHAFFRY: Untersuchungen über den enzymatischen Alkoholabbau beim Menschen unter besonderer Berücksichtigung des Intermediärstoffwechsels Klin Ws 33, 888-894 (1955)

135) TSCHEKUNOW, J.S.: Findet eine Resorption von Nahrungssubstanzen aus dem Magen statt? Ho Sey Zs 87, 314-325 (1913)

136) TUOVINEN, P.I.: Über den Alkoholgehalt des Blutes unter verschiedenen Bedingungen Skand Arch Physiol 60, 1-134 (1930)

137) De VAY, J.E., WEINHOLD, A.R. and G. ZWEIG: Properties of ethyl esters of certain amino acids as related to artifacts in paper chromatography Anal Chem 31, 815-817 (1959)

138) VERGHESE, N., SATYANARAYANA, M., RAMAKRISHNAN, P. and K. KUPPUSWAMY: Serum protein fractions in lymphogranuloma venereum J Lab clin Med 49, 370-376 (1957)

139) VERNON, H.M.: The alcoholic problem
London 1928
zitiert nach ELBEL (1937)

140) VIOLLIER, G. und W. GEISSBERGER: Über das Verhalten des Aminostickstoffs in Plasma und Urin nach intraduodenaler und intravenöser Aminosäurebelastung
Helv Phys A 5, C58 (1947)

141) VÖLTZ, W., BAUDREXEL, A. und W. DIETRICH: Über die Resorption des Alkohols durch die Harnblase
Pf A 145, 210-228 (1912)

142) VÖLTZ, W., BAUDREXEL, A. und W. DIETRICH: Einfluß des Füllungszustandes des Magen-Darmkanals auf die Alkoholausscheidung in Harn und Atmung
Pf A 145, 228-238 (1912)

143) WELLINGTON, E.F.: An ultramicro method for quantitative determination of amino acids
Can J Chem 30, 581-591 (1952)

144) WIDMARK, E.M.P.: Upsala Läk. för Förn. N. F. 19, 241 (1914)
zitiert nach MILLES

145) WIDMARK, E.M.P.: Über die Konzentration des genossenen Alkohols in Blut und Harn unter verschiedenen Umständen
Skand Arch Physiol 33, 85-96 (1916)

146) WIDMARK, E.M.P.: Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der Gerichtlichmedizinischen Alkoholbestimmung
Springer, Berlin, 1932

147) WIDMARK, E.M.P.: a) Über die Einwirkung von Aminosäuren auf den Alkoholgehalt des Blutes
Biochem Z 265, 237-240 (1933)

148) WIDMARK, E.M.P.: b) Der Einfluß der Nahrungsbestandteile auf den Alkoholgehalt des Blutes
Biochem Z 266, 134-142 (1933)

149) WINTERSTEIN, A. und B. HEGEDÜS: Über das Vorkommen des Retinens in der Natur
Ho Sey Zs 321, 97-106 (1960)

150) WISS, O.: Untersuchungen über die freien Aminosäuren im Blute bei verschiedener Ernährung
Helv chim A 31, 2148-2158 (1948)

151) WÜRMELING, H.B.: Weitere Untersuchungen über Alkoholresorption
Vortrag auf der 44. Tagung der Dt. Ges. f. Ger. u. Soc. Medizin, Hamburg 1965
zitiert nach MALLACH (1966)

152) WYNN, K. and T.N.W. WILLIAMS: Chromatographic observations on nitrogenous constituents of petroleum-ether extracts of plasma
Nature 165, 768-769 (1950)

153) ZWEIG, G.: Some artifacts in paper chromatography
Anal Chem 31, 821-824 (1959)

Herrn Professor Dr. med. H.J. Mallach danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die fachlichen Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Diplom-Chemiker Dr. rer. nat. J. Bösche bin ich für die zahlreichen Anregungen bei der Einarbeitung in die chemisch-analytische Methodik zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 14. Juli 1939 wurde ich, Reinhard Achinger, als Sohn des Pastors Carl Achinger und seiner Ehefrau Hanna Achinger, geb. Meyer in Wingeshausen im Sauerland geboren.

In Berleburg besuchte ich bis zum Jahre 1953 die Grundschule und das Mathem. Naturw. Progymnasium, danach das Staatl. Aufbaugymnasium in Laasphe, an dem ich am 5. März 1957 die Reifeprüfung ablegte.

Im Anschluß an den Wehrdienst begann ich im Herbst 1958 ein einjähriges Maschinenbaupraktikum und mit dem Wintersemester 1959/60 das Studium des Maschinenbaus an der Techn. Hochschule Stuttgart. Dieses Fach befriedigte mich jedoch nicht, so daß ich im Sommersemester 1960 das Studium der Medizin an der Universität Tübingen begann. Hier bestand ich im Frühjahr 1961 die naturwissenschaftliche und im Frühjahr 1963 die arztliche Vorprüfung. Am 6. Februar 1967 schloß ich das Studium an eben dieser Universität mit dem Staatsexamen ab.